Análisis directo de sangre y orina depositada en papel de filtro clínico mediante técnicas atómicas mono y multielementales

Luis Rello Varas

CESA
CONSEJO ECONÓMICO
Y SOCIAL DE ARAGÓN

CONSEJO ECONÓMICO Y SOCIAL DE ARAGÓN
COLECCIÓN TESIS DOCTORALES

Premio a trabajos de investigación o tesis doctorales 2014

Autor de la tesis doctoral:
Luis Rello Varas

Directores de la tesis:
Miguel Ángel Belarra Piedrafita
Martín Resano Ezcaray

Calificación obtenida:
Sobresaliente *cum laude*

La responsabilidad por las opiniones expresadas en las publicaciones del Consejo Económico y Social de Aragón incumbe exclusivamente a sus autores y su publicación no significa que el Consejo se identifique con las mismas.

2015

© De esta edición digital: Consejo Económico y Social de Aragón.
© Para otras ediciones: el autor.
Esta publicación se edita únicamente en formato digital.

Consejo Económico y Social de Aragón
c/ Joaquín Costa, 18, 1º
50071 Zaragoza (España)
Teléfono: 976 71 38 38 – Fax: 976 71 38 41
cesa@aragon.es
www.aragon.es/cesa

Premio del Consejo Económico y Social de Aragón 2014 a trabajos de investigación concluidos o tesis doctorales

El Consejo Económico y Social de Aragón, con el fin de promover y divulgar la investigación, convoca anualmente Premios a trabajos de investigación concluidos o tesis doctorales, en cuya convocatoria del año 2014, efectuada por Resolución de 22 de julio de 2014, de la Presidencia del Consejo Económico y Social de Aragón (*Boletín Oficial de Aragón* número 172, de 3 de septiembre de 2014), pudieron participar los autores de trabajos de investigación concluidos o tesis doctorales presentadas para la colación del grado de doctor leídas y calificadas de sobresaliente *cum laude*, por unanimidad, entre el 1 de octubre de 2013 y el 30 de septiembre de 2014.

Por Resolución de 17 de diciembre de 2014, de la Secretaría General Técnica de la Presidencia (*Boletín Oficial de Aragón* número 10, de 16 de enero de 2015), se otorgó el premio del Consejo Económico y Social de Aragón 2014 a trabajos de investigación concluidos o tesis doctorales.

El premio, con una dotación económica de 3.000 euros, se otorgó a la tesis doctoral "Análisis directo de sangre y orina depositada en papel de filtro clínico mediante técnicas atómicas mono y multielementales", realizada por D. Luis Rello Varas.

El Jurado, que propuso por unanimidad la concesión del Premio, estuvo compuesto por los siguientes miembros del Consejo:

Presidenta: D.ª Natividad Blasco de las Heras

Secretaria: D.ª Belén López Aldea

Vocales: D.ª Mª Ángeles López Artal
D.ª Eva Murillo Álvarez
D. Carmelo Pérez Serrano

Agradecimientos

En muchas tesis aparece "... *parece mentira que haya llegado este momento*...", pero en mi caso es totalmente oportuno, ya que empecé mis primeras medidas allá por el 2005. Entre tanto, ha habido intermitencias en el trabajo recopilado en esta Memoria originadas por distintos factores, siendo el más importante la preparación, durante casi dos años, de la oposición a Facultativo Especialista de Bioquímica Clínica. Sin embargo, durante todo este tiempo conté con la comprensión de mis directores, lo que me permitió centrarme en poder conseguir ese objetivo y luego retomar la Tesis con energías renovadas.

Por lo tanto, quiero agradecer:

A mis directores Martín Resano y Miguel Ángel Belarra. Creo esta tesis es más suya que mía. Tal vez mi contribución más importante fuera el introducirlos en un tipo de muestra que podía resultar extraña para un químico analítico como son los *dried blood spots*.

Durante todos estos años Martín Resano me ha guiado, ayudado y estimulado con sus conocimientos y capacidad investigadora, abriéndome los ojos a lo que tiene y no tiene interés desde el punto de vista científico e intentando (aunque consiguiéndo sólo en parte) quitarme el vicio de los que provenimos del mundo clínico de querer medir *miles* de muestras. Pero sobre todo, lo más importante para mi ha sido que al ir por las tardes al laboratorio de la facultad (a veces no con muchas ganas, después de toda la mañana en el hospital) me iba a encontrar con un amigo.

A Miguel Ángel Belarra por ayudar a plasmar parte de sus conocimientos y experiencia investigadora en el desarrollo de esta tesis. Agradezco especialmente las semanas (sino meses) que ha dedicado a sintetizar y organizar la Memoria que finalmente se presenta, que desde luego, se parece sólo un poco a mis primeros borradores.

Aunque pueda resultar un poco pretencioso por mi parte, cuando uno tiene unos directores así sabe que el trabajo que va a presentar es de una indudable calidad.

A mis compañeros de M.A.R.T.E.: Jorge Briceño, Maite Aramendía, Esperanza García, Charo Flórez, Ana Cris Lapeña y Engracia Mozas, por su ayuda y amistad. Es de justicia que destaque la colaboración primero de Jorge Briceño y después de Charo Flórez, porque sin su ayuda con los equipos de absorción atómica muchas tardes me hubiese sido imposible realizar las medidascuando el muestreador se ponía *rebelde*.

Los trabajos de ablación láser, debido a la complejidad de la técnica y a los laboratorios donde se han realizado las medidas, han contado con la colaboración de muchas personas. Para el trabajo realizado en Gante debo agradecer especialmente a Maite Aramendía toda su contribución en el diseño de los experimentos, la realización de las medidas y el tratamiento de los datos. Para el trabajo realizado en Pau, tanto Maite como Martín Resano tuvieron un papel clave en el diseño de los experimentos y el tratamiento de los datos, mientras que Christophe Pécheyran llevó la voz cantante en el manejo del instrumento y la realización de las medidas.

Aprovecho también para mencionar a mis compañeros del Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Miguel Servet.

A mi Jefe de Servicio, Dr. Ángel García de Jalón Comet, por su confianza, ayuda y amistad, a pesar de mi tendencia a *subirme a la parra*. Desde luego, los más jóvenes del Servicio siempre le estaremos agradecidos por supelea por mantener puestos de trabajo de facultativo en una época tan mala para la sanidad pública y por su defensa de la especialidad de BioquímicaClínica.

A la Dra. Luisa Calvo Ruata, por su colaboración con las mediciones de plomo y cobre en el Hospital y con quien comparto una especial predilección por el cobre y el diagnóstico de la enfermedad de Wilson. Además, es difícil encontrar una persona mejor.

Al resto de amigos y compañeros del Servicio.

A mis padres, hermanos, sobrinos y cuñada. Desde luego, si algo ha sido posible fue gracias al esfuerzo de mis padres, personas humildes y trabajadoras que consiguieron dar carrera a sus cuatro hijos, no con privaciones pero sí con mucho sacrificio. Así que, mamá, te perdono aquello que me dijiste no hace mucho, cuando ya con mis 40 años te dije que iba a la facultad y me respondiste: "*hijo..., si hubiese estudiado tanto como tú, yo hubiera sido por lo menos ministra*".

Finalmente, por supuesto, a Elena. Lo siento, pero lo que te tengo que decir no se puede escribir.

Publicaciones

El trabajo que se presenta en esta Memoria ha dado lugar, hasta el momento, a las siguientes publicaciones:

- **Minimally-invasive filter paper test in combination with solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for Pb determination in wholeblood**

  M. Resano, L. Rello, E. García-Ruiz, M.A. Belarra

  Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2007, 22, 1250–1259.

- **On the possibilities of high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple atomic lines**

  M. Resano, L. Rello, M. Flórez, M.A. Belarra

  Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 2011, 66, 321–328.

- **Direct trace-elemental analysis of urine samples by laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry after sample deposition on clinical filter papers**

  M. Aramendía, L. Rello, F.Vanhaecke, M. Resano

  Analytical Chemistry, 2012, 84, 8682–8690.

- **A driedurine spot test tosimultaneously monitor Mo and Ti levels using solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry**

  L. Rello, A.C. Lapeña, M.Aramendía, M.A. Belarra, M. Resano

  Spectrochimica Acta Part B: Atomic Spectroscopy, 2013, 81, 11–19.

- **Direct determination of Cu isotope ratios in driedurine spots bymeans of fs-LA-MC-ICPMS. Potential to diagnose Wilson's disease**

  M. Resano, M. Aramendía, L. Rello, M.L. Calvo, S. Bérail, C. Pécheyran

  Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2013, 28, 98–106.

- **Isotopic analysis of Cu in serum samples for diagnosis of Wilson's disease: a pilot study**

  M. Aramendía, L. Rello, M. Resano, F. Vanhaecke

  Journal of Analytical Atomic Spectrometry, 2013, 28, 675–681.

Listado de acrónimos

AAS	Espectrometría de absorción atómica (*Atomic Absorption Spectrometry*)
AES	Espectrometría de emisión atómica (*Atomic Emission Spectrometry)*
BLL	Concentración de plomo en sangre (*Blood lead levels*)
CCD	Detector de tipo "dispositivo de carga acoplada" (*Charge-Coupled Device*)
CE	Electroforesis capilar (*Capillary Electrophoresis*)
cps	Cuentas por segundo (*counts per second*)
CRM	Material de Referencia Certificado (*Certificate Reference Material*)
DART	*Direct Analysis in Real Time*
DBS	Muestra de sangre depositada y secada sobre papel de filtro (*Dried blood spot*)
DESI	*Desorption Electrospray Ionisation*
DMS	Muestra biológica depositada y secada sobre papel de filtro (*Dried matrix spot*)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (*Deoxyribonucleic Acid*)
DSR	Desviación estándar relativa
DUS	Muestra de orina depositada y secada sobre papel de filtro (*Dried urine spot*)
ETV	Vaporización electrotérmica (*Electrothermical Vaporization)*
FNR	Tasa de falsos negativos (*False Negative Rate)*
FPR	Tasa de falsos positivos (*False Positive Rate)*
GC	Cromatografía de gases (*Gas Chromatography*)
GC-MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas
GC-MS/MS	Cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas en tándem
GF-AAS	Espectrometría de absorción atómica con horno de grafito (*Graphite Furnace Atomic Absorption Spectrometry*)
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución (*High Performance Liquid Chromatography*)
HPLC-MS/MS	Cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas en tándem
^{1}H-NMR	Resonancia magnética nuclear (*Nuclear Magnetic Resonance*) de ^{1}H.
ICP	Plasma de acoplamiento inductivo (*Inductively Coupled Plasma)*
ICP-MS	Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (*Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry)*
IR	Infrarrojo
LA	Ablación láser (*Laser Ablation)*
LA-ICP-MS	Ablación láser acoplada a espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo (*Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometry)*

LC	Cromatografía líquida (*Liquid Chromatography*)
LC-MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas
LC-MS/MS	Cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem
LC-UV	Cromatografía líquida con detección por absorción ultravioleta
LOD	Límite de detección (*Limit of detection*)
$\mathbf{m_o}$	masa característica
MS	Espectrometría de masas (*Mass Spectrometry*)
MS/MS	Espectrometría de masas en tándem
NCCLS	*National Committee for Clinical Laboratory Standards*
NPV	Valor predictivo negativo (*Negativ ePredictive Value)*
PC-DBS	Muestra de sangre depositada y secada sobre discos de papel de filtro precortados (*Precut-Dried blood spot*)
PCR-DNA	Amplificación de DNA mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*Polimerase Chain Reaction*)
PPV	Valor predictivo positivo (*Positive PredictiveValue)*
PS	*Paper Spray Ionization*
PS-DUS	Muestra de orina depositada y secada sobre un trozo de papel de filtro con difusión controlada (*Precut-Saturated-Dried blood spot*)
PS-MS	*Paper Spray Ionization* acoplada a espectrometría de masas
$\mathbf{Q_A}$	Absorbancia integrada
TLC	Cromatografía en capa fina (*Thin Layer Chromatography*)
UV	Ultravioleta

Índice

I. Introducción 14

I.1. El papel de filtro como soporte para el análisis de muestras biológicas 15

I.1.1. Ventajas de la deposición de muestras biológicas sobre papel de filtro 16

I.1.2. Tipos de papel de filtro 18

I.1.3. Esquema general del análisis de muestras biológicas con los *DMS* 20

I.2. El proceso analítico con los *DMS* 22

I.2.1. Deposición de las muestras 22

I.2.2. Conservación de los *DMS* 27

I.2.3. Troquelado de los *DMS* 28

I.2.4. Lixiviación del analito 30

I.2.5. Identificación o determinación del analito 32

I.3. Determinaciones elementales con los *DMS* 39

I.3.1. Determinaciones elementales sobre los *DMS* tras lixiviar al analito 40

I.3.2. Determinaciones elementales directas sobre los *DMS* 41

I.4. Objetivos del trabajo 44

I.5. Bibliografía 46

II. Experimental 53

II.1. Instrumentos, aparatos y material 54

II.1.1. Instrumentos de absorción atómica 54

II.1.2. Instrumentos de *LA-ICP-MS* 57

II.1.3. Aparatos y material 58

II.2. Patrones y reactivos 61

II.2.1. Materiales de referencia 61

II.2.2. Disoluciones patrón 61

II.2.3. Otros reactivos 62

II.3. Obtención y preparación de las muestras 63

I.3.1. Población utilizada para los análisis de sangre 63

II.3.2. Recogida de sangre venosa 63

II.3.3. Recogida de sangre capilar: preparación de los *DBS* 63

II.3.4. Recogida de orina 64

II.3.5. Preparación de *DUS* de difusión libre 64

II.3.6. Preparación de *DUS* de difusión controlada (*PS-DUS*) 65

II.4. Preparación de los patrones para el calibrado 66

II.4.1. Patrones para la determinación de plomo en sangre retenida en un *DBS* 66

II.4.2. Patrones para la determinación de titanio y molibdeno en orina retenida en un *PS-DUS* 66

II.4.3. Patrones para la determinación multielemental en orina retenida en un *PS-DUS* con calibración externa 67

II.4.4. Patrones para la determinación multielemental en orina retenida en un *PS-DUS* con calibración mediante dilución isotópica 67

II.5. Procedimientos operativos 69

II.5.1. Determinación de plomo en sangre venosa líquida 69

II.5.2. Determinación de plomo en sangre retenida en un *DBS* 69

II.5.3. Método de criba de plomo en sangre retenida en un *DBS* 71

II.5.4. Determinación simultánea de titanio y molibdeno en orina retenida en un *PS-DUS* 71

II.5.5. Determinación multielemental en orina líquida 72

II.5.6. Determinación multielemental en orina retenida en un *PS-DUS* con calibración externa 73

II.5.7. Determinación multielemental en orina retenida en un *PS-DUS* con calibración mediante dilución isotópica 74

II.5.8. Determinación de cobre en orina líquida 75

II.5.9. Determinación de la relación isotópica $^{65}Cu/^{63}Cu$ en orina retenida en un *PS-DUS* 75

II.6. Bibliografía 78

III. Resultados y discusión 79

III.1. Determinación directa de plomo en sangre en los *DBS* mediante *GF-AAS* con fuente de línea 80

III.1.1. Condiciones de atomización del plomo en disolución acuosa 84

III.1.2. Condiciones de atomización del plomo en sangre 86

III.1.3. Estudio de la deposición de sangre en papel de filtro 89

III.1.4. Calibrado 93

III.1.5. Resultados de la determinación de plomo en sangre 95

III.1.6. Conclusiones 99

III.1.7. Bibliografía 99

III.2. Método de criba de plomo en sangre en los *DBS* mediante *GF-AAS* con fuente continua 103

III.2.1. Determinación directa de plomo en los *DBS* mediante *GF-AAS* con fuente continua 105

III.2.2. Desarrollo del modelo para la criba de plomo en sangre 106

III.2.3. Resultados de la criba de plomo en sangre 109

III.2.4. Conclusiones 113

III.2.5. Bibliografía 113

III.3. Evaluación de posibles ventajas de la *GF-AAS* con fuente continua para determinaciones en sangre y orina 116

III.3.1. Estudio de interferencias espectrales en las medidas de plomo en sangre 119

III.3.2. Extensión del rango lineal para la determinación de plomo en sangre 123

III.3.3. Uso de un patrón interno para las medidas de níquel en orina y sangre ... 126

III.3.4. Conclusiones 131

III.3.5. Bibliografía 132

III.4. Determinación directa y simultánea de molibdeno y titanio en orina en los *DUS* mediante *GF-AAS* con fuente continua 134

III.4.1. Elección de la longitud de onda de trabajo 137

III.4.2. Condiciones de atomización en muestras líquidas 139

III.4.3. Estudio de la deposición de orina sobre papel de filtro en condiciones de difusión libre 144

III.4.4. Estudio de la deposición de orina sobre papel de filtro en condiciones de difusión limitada 148

III.4.5. Calibrado..... 151

III.4.6. Validación de la determinación directa y simultánea de molibdeno y titanio en orina..... 153

III.4.7. Conclusiones..... 154

III.4.8. Bibliografía..... 155

III.5. Análisis directo multielemental de orina en los *DUS* mediante *LA-ICP-MS* 158

III.5.1. Estudio detallado sobre la distribución de la orina en el papel de filtro..... 159

III.5.2. Condiciones para realizar la ablación 163

III.5.3. Calibrado..... 164

III.5.4. Análisis de muestras reales 172

III.5.5. Conclusiones..... 173

III.5.6. Bibliografía..... 174

III.6. Determinación directa de la relación isotópica de cobre en orina en los *DUS* mediante *LA-ICP-MS* como diagnóstico de la enfermedad de Wilson 176

III.6.1. Consideraciones sobre la sensibilidad y la deposición de la muestra..... 179

III.6.2. Monitorización de las muestras por *LA-ICP-MS* con detectores multicolectores y potenciales interferencias..... 180

III.6.3. Cálculo de la relación isotópica en el caso de señales transitorias de corta duración 184

III.6.4. Análisis de las muestras..... 188

III.6.5. Conclusiones..... 191

III.6.6. Bibliografía..... 192

IV. Conclusiones 195

Anexo. Artículos publicados 197

I. Introducción

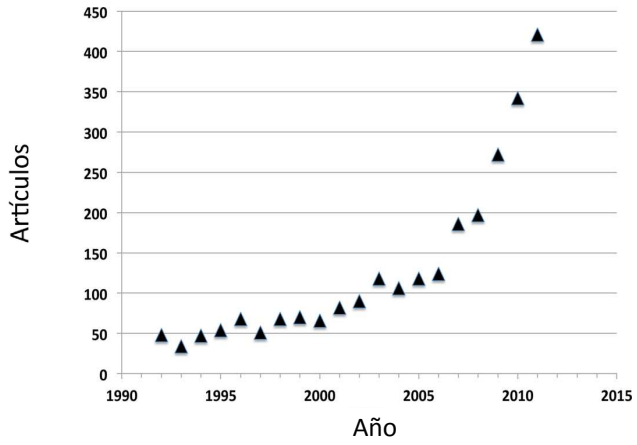
I.1. El papel de filtro como soporte para el análisis de muestras biológicas.

Hace 50 años, en 1963, R. Guthrie y A. Susi publicaron en el Reino Unido el trabajo seminal en el que describían la recogida de sangre capilar del talón de recién nacidos y, tras depositarla en un papel de filtro y permitir que se secara, determinaban la fenilalanina (mediante un método de inhibición bacteriana, hoy en desuso) para la detección de fenilcetonuria [1].

Pese a que el primer microanálisis sobre sangre depositada en un papel de filtro había sido descrito por Bang en 1913, para la determinación de los niveles de azúcar sanguíneo mediante valoración con una disolución de yodo diluida [2], fue el trabajo de R. Guthrie y A. Susi el que sentó las bases conceptuales y metodológicas de una forma de trabajo que ha facilitado el diagnóstico y tratamiento precoz de múltiples anomalías congénitas y hereditarias mediante los programas de cribado neonatal. Desde entonces, el análisis a gran escala de los denominados *DBS* (*Dried Blood Spot*) en estos programas ha salvado y cambiado muchas vidas en los países industrializados [3].

A partir de este trabajo pionero el número de analitos investigados en los *DBS* se fue incrementado constantemente, especialmente con la introducción de la espectrometría de masas en tándem (*MS/MS*), con aplicaciones en los campos del diagnóstico metabólico-endocrino, farmacéutico, toxicológico, serológico y de biología molecular [4-7]. En la Figura I.1 se puede observar la evolución de los artículos de investigación (búsqueda de la expresión *Dried Blood Spot* en la *Web of Knowledge*) desarrollados sobre *DBS* en los últimos veinte años, en la que destaca el crecimiento exponencial de los últimos tres años con más de 1200 artículos [3].

Figura I.1. Número de publicaciones por año que contienen el término *Dried Blood Spot*.



Este importante incremento en el número de publicaciones puede relacionarse con el creciente interés que, en los últimos años, ha mostrado la industria farmacéutica por esta metodología [8]. Su utilización por este sector productivo, tan potente como obligatoriamente conservador en sus procedimientos, significa un aval de la utilidad de la metodología de los *DBS* que aportan ventajas éticas, prácticas, científicas y económicas [9].

Recientemente, S. Tanna y G. Lawson han publicado una revisión crítica sobre el uso de los *DBS* [10] y el *European Bioanalysis Forum* ha publicado un artículo con amplias recomendaciones para la validación de métodos bioanalíticos con uso de aquéllos [8]. Más actual todavía es la revisión de Demirev sobre los métodos y aproximaciones analíticas

introducidas en los últimos años en el análisis de los *DBS*, como por ejemplo las técnicas de análisis directo o sistemas automatizados, que probablemente tengan gran importancia en las futuras aplicaciones basadas en los *DBS* [3].

Aunque la inmensa mayoría de los trabajos realizados hasta la fecha que utilizan la deposición de fluidos biológicos sobre papel de filtro se han centrado en el estudio de la sangre, parece evidente que puede utilizarse con otras muestras. Desde hace años se han realizado estudios con orina generando los denominados *DUS* (*Dried Urine Spot*) [11] dedicados en su mayor parte a la determinación de analitos de interés en el estudio de metabolopatías (aminoácidos y ácidos orgánicos) [12] y enfermedades de almacenamiento lisosomales (macromoléculas orgánicas poliméricas) [13].

Finalmente, se puede citar que en los últimos años han aparecido trabajos aplicados al líquido cefalorraquídeo [14] y al líquido amniótico [15,16]. Las muestras biológicas contenidas en un papel de filtro seco reciben el nombre genérico de *DMS* (*Dried Matrix Spot*).

I.1.1. Ventajas de la deposición de muestras biológicas sobre papel de filtro.

Las ventajas esenciales de los *DMS* son la facilidad de la toma de muestra y de la conservación y transporte de la misma ya que de éstas se derivan las de carácter asistencial, económicas o científicas.

Facilidad de la toma de muestra.

Esta ventaja es especialmente importante en el caso de la sangre. El desarrollo de la metodología de los *DBS* fue parejo con la expansión del cribado neonatal, dado que el método de recoger sangre capilar en papel de filtro resulta muy atractivo para el cribado masivo de niños por las siguientes razones [17]:

1) Se requiere un cantidad muy pequeña de sangre.

2) La punción con una lanceta del talón (neonatos) o del dedo (niños pequeños) es más fácil y menos traumática que la recogida convencional de sangre venosa.

3) La recogida puede ser realizada por personal no especializado.

En otro contexto como es la fase de experimentación de nuevos fármacos o tratamientos, la recogida de sangre en roedores es *terminal* y se requiere un nuevo animal para cada medida. La metodología de los *DBS* permite muestreos seriados a partir de un único ejemplar y, de esta forma, las compañías farmacéuticas pueden cumplir la *doctrina 3R* (Reducción, Refinamiento y Reemplazo) con respecto a los experimentos con animales [10].

Para otras muestras estas ventajas no son tan claras: le recogida convencional de orina es sencilla y, en cuanto a muestras como líquido cefalorraquídeo o líquido amniótico, debe ser realizada por personal médico especializado tras la hospitalización del paciente.

Facilidad de transporte y conservación.

Los requisitos de transporte y conservación de los especímenes biológicos recogidos sobre un papel de filtro son mucho menos estrictos que para las muestras líquidas. De hecho, dichos papeles secos pueden ser remitidos por correo ordinario lo que puede tener una importancia notable en países del tercer mundo o en localizaciones remotas. Si el análisis se realiza antes de un mes tras la recogida, en general, se permite su conservación a temperatura ambiente,

aunque para periodos más prolongados se recomienda la conservación refrigerada en condiciones de humedad controlada.

Esta característica está adquiriendo cada vez mayor importancia. Por ejemplo, muchos metabolitos urinarios son poco estables por lo que, si hay que conservar la orina, debe congelarse (a –20 ºC o –80 ºC) lo que complica notoriamente la logística de los laboratorios clínicos, que a menudo tienen que tratar a diario con cientos de muestras. Dado que la mayoría de los procesos de degradación de la orina son de carácter enzimático en vía húmeda, la conservación de la muestra en un papel de filtro seco ralentiza dichos procesos.

Mejora de las condiciones asistenciales.

En el aspecto asistencial la metodología de los *DMS*, al permitir la recogida de la muestra biológica en el hogar, por un familiar o el propio paciente, mejora la calidad de vida de los enfermos que deban someterse periódicamente a este tipo de pruebas, como los pacientes crónicos que requieran controles frecuentes (transplantados inmunosuprimidos, anticoagulados, etc) o de aquellos con movilidad reducida o que puedan estar postrados en cama.

Además, puede conducir a un ahorro de costes sanitarios (horas de personal dedicado a la recogida de las muestras) y empresariales (pérdida de horas de trabajo por tener que acudir el paciente con frecuencia a un centro sanitario).

Aumento de la participación en programas preventivos poblacionales o epidemiológicos.

Tanto los programas preventivos poblacionales como los epidemiológicos, sean prospectivos o retrospectivos, hacen uso de la medida de biomarcadores y en este tipo de estudios la colaboración de la población es fundamental. Ahora bien, dicha colaboración supone ciertos inconvenientes a los sujetos participantes: la recogida de muestra puede ser molesta (por ejemplo, la extracción de sangre) y suele tener que trasladarse a un centro sanitario para la recogida o entrega. Cuando el estudio es epidemiológico, en el que los participantes no ven un claro beneficio por su colaboración (en contraste con un programa de prevención o diagnóstico temprano de una enfermedad), estos inconvenientes pueden pesar más que su espíritu colaborativo.

En estas situaciones, la incorporación de protocolos de recogida de estos bioespecímenes en el hogar y el fácil envio de los mismos debe redundar en una mayor participación [18,19]. Como indican McDade *et al*.: "… recae sobre el investigador la responsabilidad de llevar nuestros métodos a las personas en la comunidad, en lugar de confiar en que las personas seleccionadas acudan a un laboratorio y/o centro sanitario" [5]. El uso de los *DMS* (especialmente *DBS* y *DUS*) puede ser una ayuda en estas situaciones, ya que los puede preparar el propio participante en su casa y enviarlos por correo al centro sanitario.

Realización de investigaciones retrospectivas con las muestras procedentes del cribado neonatal.

Puesto que los *DBS* son recogidos a la práctica totalidad de los recién nacidos en muchos países de todo el mundo, esta matriz ofrece una vía de preservar sangre total con la que puedan realizarse investigaciones retrospectivas en ámbitos clínicos, epidemiológicos y toxicológicos, midiendo compuestos tan diversos como aminoácidos, ácidos orgánicos, acilcarnitinas, hormonas peptídicas y esteroideas, pesticidas, metales, ácidos nucleicos, agentes infecciosos, anticuerpos y otros marcadores inmunitarios y aductos de proteínas, como los carcinógenos. En el año 2007 se realizó una reunión en Estados Unidos con objeto de examinar la utilidad de los *DBS* para la medida de exposición de contaminantes medioambientales y otros analitos de interés en estudios epidemiológicos [20].

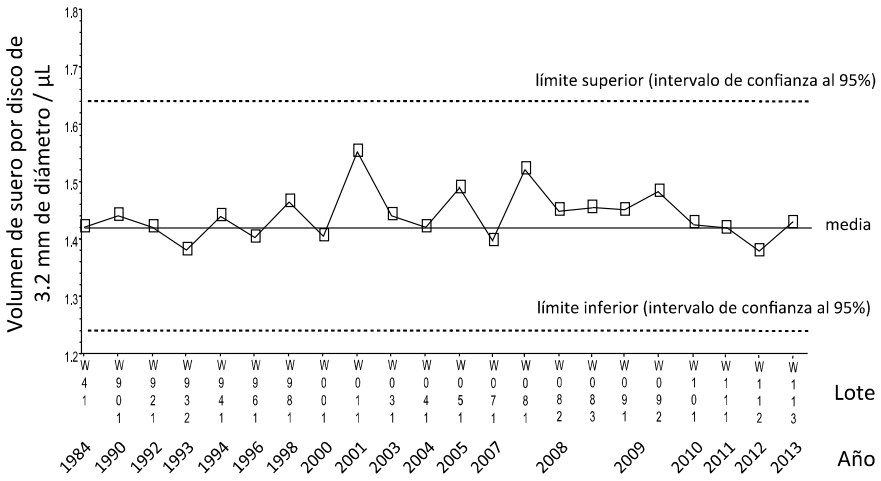
I.1.2. Tipos de papel de filtro.

En el mercado existe una gran variedad de tipos de papel de filtro para su utilización con fines clínicos que se diferencian, entre otras propiedades, en el gramaje, grosor, velocidad de absorción y existencia o no de aditivos químicos para aplicaciones particulares. Los requisitos fundamentales de un papel de filtro para lograr resultados analíticos reproducibles son que su capacidad de absorción de la muestra y la difusión de la misma sean uniformes entre las distintas zonas de un mismo papel y que estas propiedades se mantengan, tanto entre las diferentes unidades de papel de un mismo lote, como entre lotes diferentes.

En el caso de los *DBS* hay que resaltar que un aspecto básico de su utilización es que el papel de filtro utilizado retenga una cantidad constante de sangre por unidad de superficie (por supuesto, dentro de unos límites establecidos), de forma que para realizar la cuantificación de los analitos no sea necesario conocer el volumen preciso de sangre que se deposita. El *Clinical and Laboratory Standard Institute* ha fijado unos requisitos para que los papeles de filtro puedan ser utilizados en la preparación de los *DBS* para el cribado neonatal. El volumen de suero que debe retenerse en un disco de 3.2 mm es de 1.54 ± 0.17 µL (3.42 µL de sangre) para *spots* formados al depositar 100 µL de sangre que contiene células intactas (sin lisar) con un hematocrito de 0.55 [21] (aunque, como puede verse en la figura I.2 para el papel Whatman 903, el valor medio obtenido es algo inferior al especificado y se encuentra justo en el límite de tolerancia [22]).

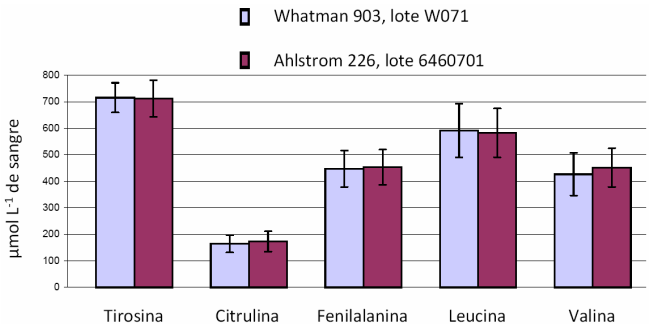
Aceptando los requisitos establecidos por el *Clinical and Laboratory Standards Institute* y la *Food and Drug Administration* norteamericanos, actualmente sólo existen dos tipos de papel de filtro que están aprobados como dispositivos médicos de clase II, el Whatman 903 y Ahlstrom 226 (ahora Perkin Elmer 226), que están fabricados al 100 % con fibras de algodón y no contienen aditivos. En los papeles de filtro dedicados al cribado neonatal, el cumplimiento de estos requisitos es controlado por el *Newborn Screening Quality Assurance Program* que ha desarrollado un procedimiento para evaluar la uniformidad del papel y sus propiedades de absorción por medida del tiempo de absorción y del diámetro de los círculos generados, así como del volumen de sangre o suero retenido en discos de 3.2 mm de diámetro [4,23,24]. En la Figura I.2 se muestran los resultados obtenidos en distintos lotes del papel Whatman 903 fabricados a lo largo de más de 20 años [22].

Figura I.2. Variación del volumen de suero retenido en lotes de papel Whatman 903.



Recientemente, además de comprobar su capacidad para retener la sangre, los dos tipos de papel aprobados como dispositivos médicos de clase II fueron sometidos a un estudio comparativo midiendo la concentración de los analitos determinados habitualmente en el cribado neonatal [24]. Como puede verse en la Figura I.3, ambos papeles son virtualmente idénticos en cuanto a sus prestaciones analíticas.

Figura I.3. Ensayo comparativo de los papeles Whatman 903 y Perkin Elmer 226 para distintos analitos determinados en los programas de cribado neonatal.



Resultados de cinco laboratorios (n=20), excepto para la valina (cuatro laboratorios, n=16). Los valores de imprecisión se expresan como la desviación estándar de todos los resultados.

Con los niveles de calidad alcanzados, Mei *et al.* señalaban que: "podría afirmarse que el papel de filtro, como dispositivo de recogida de sangre, ha logrado el mismo nivel de precisión y reproducibilidad que tanto los investigadores como analistas clínicos han de esperar de otros métodos de recogida de sangre, como tubos de vacío y pipetas capilares, y, como estos dispositivos, el papel de filtro tiene asociado un nivel de imprecisión que debe ser caracterizado para estandarizar y minimizar las variaciones en las medidas debidas a la matriz del papel de filtro" [4].

Papeles de filtro pretratados químicamente.

Con objeto de mejorar sus prestaciones analíticas, muy frecuentemente aumentar la estabilidad de los *DMS* generados, el papel de filtro se puede tratar con algunas sustancias químicas antes de la deposición de la muestra biológica.

En la actualidad se dispone de papeles de filtro comerciales que están pretratados químicamente, como por ejemplo, el DMPK-A (antes Whatman FTA) y el DMPK-B (antes Whatman FTA Elute). Ambos están diseñados para causar la inactivación de patógenos y la inhibición de enzimas en el análisis de DNA y pequeñas moléculas. El tratamiento de estos papeles está patentado (no es de conocimiento público) y, según el fabricante, al contacto con la sangre lisan las células, desnaturalizan las proteínas y previenen el crecimiento de las bacterias y otros microorganismos.

En los últimos años, han aparecido trabajos que utilizaban estos papeles en la determinación de fármacos y sus metabolitos [25-27], pero hasta la fecha no hay métodos establecidos en la rutina clínica usando estos tipos de papel y no está claro si los compuestos químicos utilizados inciden en los resultados obtenidos con la espectrometría de masas o en la cuantificación de otros analitos. De hecho, varios investigadores han obtenido mejores resultados con los papeles de filtro convencionales que con los pretratados químicamente, en diversas aplicaciones clínicas sobre los *DBS* [28-30].

Al margen de estos productos comerciales, diversos investigadores han propuesto soluciones particulares para algunas situaciones concretas en los *DBS*. Por ejemplo, el uso de ácido tartárico para lograr una recuperación elevada y reproducible de lumefantrina [31], el 1,4-ditiotreitol para la determinación de captopril [32] o una mezcla de plasma, ácido fórmico

1,4-ditiotreitol para la determinación de captopril [32] o una mezcla de plasma, ácido fórmico y acetato amónico en la determinación de everolimus [33]. Liu *et al*. encontraron que la estabilidad de un compuesto estudiado como posible fármaco decrecía rápidamente durante el proceso de secado del *DBS* como consecuencia de la oxidación de un grupo tiol y, aunque el uso del DMPK-B mejoraba ligeramente la situación, encontraron que el pretratamiento con ácido cítrico evitaba la degradación durante más de 48 días [34].

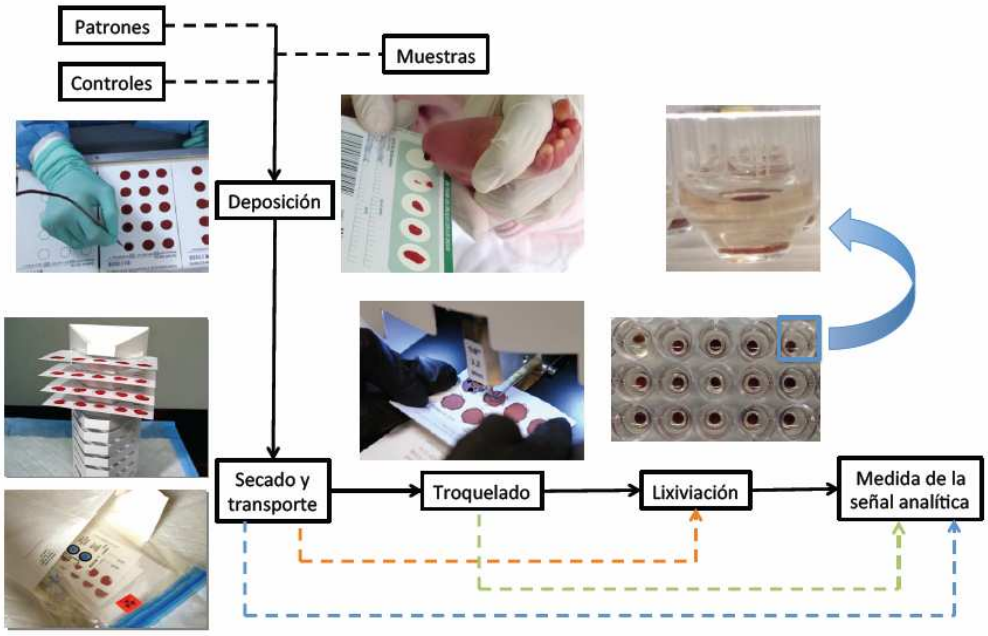
Aunque supone una mejora meramente operativa, se puede citar que, recientemente, Whatman ha comercializado papeles de filtro coloreados, de forma que se aprecia más fácilmente la zona de depósito de muestras incoloras o difíciles de ver una vez secas y se puede troquelar siempre de la misma zona.

Pese a que sólo entre tangencialmente en este apartado, merece la pena citar el interesante trabajo de Zhang *et al*., que utilizaron papel de celulosa recubierto de sílice (SG81 de Whatman, usado normalmente para separaciones cromatográficas en capa fina) en la determinación de diversas drogas terapéuticas por *Paper Spray Ionization-MS*. La sílice recubre la capa de celulosa y dificulta la penetración de la sangre en el papel, quedando de forma preferente en la cara del mismo en la que se deposita; en estas condiciones la elución e ionización directa desde la superfice mejora notablemente, incrementándose la sensibilidad en dos órdenes de magnitud [35].

I.1.3. Esquema general del análisis de muestras biológicas con los *DMS*.

Las principales etapas del procedimiento analítico más habitual cuando se trabaja con los *DMS*, que se esquematizan en la Figura I.4, son:

Figura I.4. Esquema general del análisis con los *DMS*.



a) Deposición de la muestra en el papel de filtro.

b) Secado del papel y envio del *DMS* al laboratorio.

c) Troquelado del *DMS* para obtener fracciones de dimensiones perfectamente conocidas con las que se continua el proceso analítico. Alternativamente, aunque no es la forma de trabajo más extendida, dicho proceso analítico se puede realizar sobre la totalidad del *DMS*.

d) Lixiviación del analito o los analitos contenidos en el *DMS* con un disolvente adecuado. Hay descritos unos pocos procedimientos en los que se omite este proceso de lixiviación.

e) Obtención de la señal analítica a partir de la disolución resultante de la lixiviación (directamente del *DMS* si se ha omitido el proceso de lixiviación).

Las principales características de estas operaciones se comentan en el Apartado I.2. Para una lectura más sencilla del mismo merece la pena adelantar que, para la obtención de resultados cuantitativos, la forma más frecuente de calibrado es mediante patrones emparejados (*matrix-matched standards*, es decir, patrones de composición análoga a la de la muestra y en los que la concentración del analito es conocida) que se someten al mismo proceso analítico que las muestras, tal como se indica en la Figura I.4.

Con esta forma de trabajo se pueden compensar ciertas variables del proceso (deposición de muestra, rendimiento de la lixiviación, etc.), siempre que sean perfectamente reproducibles.

I.2. El proceso analítico con los *DMS*.

Aunque, tal como se ha descrito en el Apartado I.1.1, la obtención de resultados analíticos a partir de los *DMS* presenta algunas ventajas evidentes sobre los procedimientos convencionales, el proceso analítico que hay que desarrollar para ello (ver la Figura I.4) obliga a realizar una serie de operaciones no habituales en la práctica cotidiana de los análisis clínicos que pueden tener una importancia decisiva en la calidad de dichos resultados.

I.2.1. Deposición de las muestras.

En la deposición de la muestra sobre el papel de filtro deben tenerse en cuenta aspectos técnicos (forma de realizarla) y analíticos, especialmente el control de la cantidad de muestra que se somete al proceso analítico. A estos efectos, cuando el *DMS* se va a utilizar para obtener resultados cuantitativos, se pueden seguir dos aproximaciones:

a) Deposición de un volumen conocido de muestra. Para ello se puede utilizar un capilar heparinizado graduado o, incluso, una micropipeta; en estas condiciones, lo normal es continuar el procedimiento analítico sobre la totalidad del *DMS*.

b) Deposición de un volumen desconocido de muestra. Este procedimiento, típico de los *DBS*, está basado en que el papel de filtro utilizado retenga un volumen de muestra constante por unidad de superficie. Aunque troquelando fragmentos de superficie conocida se puede saber el volumen de muestra que contiene, esta dato es innecesario para la obtención de resultados cuantitativos pues basta troquelar superficies iguales de los patrones emparejados y de las muestras.

Desde un punto de vista estrictamente analítico, la primera aproximación parece más segura pero presenta el inconveniente de dificultar la toma de muestra, sobre todo si se pretende que la realice personal no especializado (el propio paciente o su entorno). Con ello se perdería una de las grandes ventajas de los *DMS* por lo que la opción en principio preferida es la deposición de un volumen desconocido de muestra. En este sentido, la conjunción de los dos procedimientos (pipeteo y deposición de un volumen conocido y posterior troquelado del *DMS*) utilizada en algunos trabajos recientes [27,36], debe considerarse restringido al ámbito investigador.

Deposición de sangre.

La deposición de la sangre sobre el papel de filtro está bien establecida en la práctica clínica y se describe de forma detallada en documentos del *National Health Service* (*Guidelines for Newborn Blood Spot Sampling,* Reino Unido, 2012) [37], del *National Committee on Clinical Laboratory Standards Documents* (LA4-A5, EEUU, 2007) [21], así como en distintas revisiones [4].

La sangre capilar se puede tomar de varios sitios como los lóbulos de las orejas, las puntas de los dedos o la zona externa del talón; para niños y adultos se prefiere la punción del dedo índice o corazón de la mano no dominante y para neonatos y lactantes la del talón. La piel del paciente se esteriliza con isopropanol al 70% y se deja secar al aire; se calienta la zona de extracción (masajeando suavemente o bien con un paño caliente seco y limpio) para que la sangre fluya con mayor facilidad y se realiza la punción usando una lanceta de 1 mm (Reino

Unido) o 2 mm (EEUU) de largo. La primera gota de sangre debe desecharse, debido a la posible presencia de líquido intersticial y material intercelular procedente de la punción.

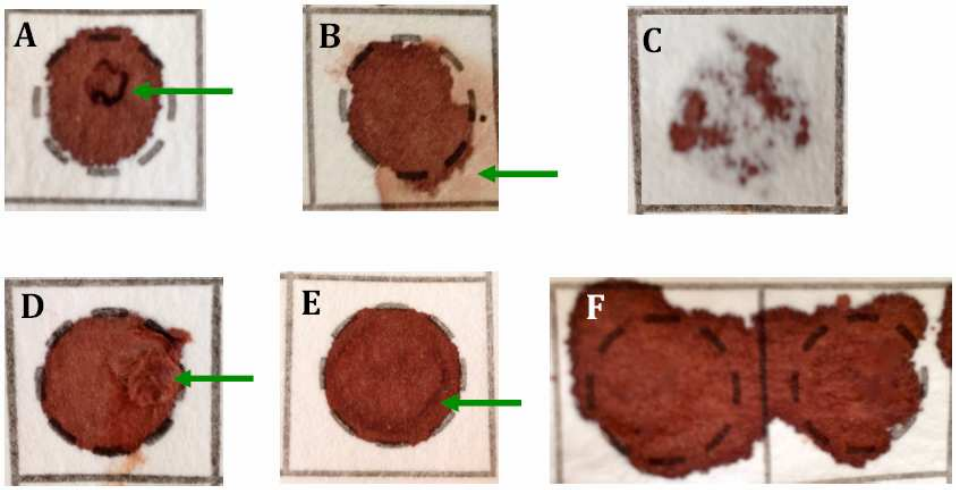
En la deposición de la sangre sobre el papel se debe tener cuidado de que cada círculo marcado sobre la tarjeta se rellene de sangre por completo en una sola aplicación y que ambos lados del papel están saturados de sangre. Evidentemente no se debe tocar el papel (en la zona de muestreo) ni con la piel ni con el capilar o pipeta. En general, para el cribado neonatal es necesario rellenar entre 4 y 6 círculos (marcados sobre cada tarjeta) que vienen a suponer un volumen de entre 50 y 75 µL de sangre en cada caso.

Se han realizado muchos estudios sobre el posible efecto del volumen variable de sangre en la formación de los *DBS* y, en general, para la mayoría de las aplicaciones resulta que no es necesario el pipeteo sobre el papel de filtro de un volumen controlado de sangre, siempre que ésta se extienda homogéneamente y que se troquele un disco de tamaño constante [26,27,38-40]. No obstante, existe algún trabajo contradictorio como el de Adam *et al.* que encontraron que la concentración de fenilalanina medida en los *DBS* formados con 35 µL (85.1 ± 4.7 mg L^{-1} de sangre) era inferior que la de los formados con 100 µL (95.5 ± 9.1 mg L^{-1} de sangre) [41].

En general, se considera que es suficiente con que la superficie del *DBS* generado no varíe en exceso para lo que en la mayoría de los casos basta una simple inspección visual. Más preciso, el *European Bioanalysis Forum* proporciona la siguiente guía: "si la deposición de la sangre sobre el papel se realiza usando pipetas calibradas, no es necesario analizar el efecto del volumen variable. Si la deposición se realiza usando material no preciso (por ejemplo, capilares no calibrados) es necesario realizar la validación de cuales son los volúmenes dentro de los cuales el método no muestra desviación significativa (error total inferior al 15%). Se considera suficiente analizar la variación del volumen dentro del ±50% del volumen ideal" [8].

Pese a la sencillez de la deposición de sangre sobre el papel de filtro puede darse el caso de muestras mal recogidas que no son aceptables para el análisis. Algunas de estas situaciones se ilustran en la Figura I.5.

Figura I.5. Ejemplos de deposición incorrecta de la sangre en un *DBS*.



A) Muestra con coágulo. B) Muestra con anillos de suero. C) Muestra insuficiente. D) *DBS* con ralladuras. E) *DBS* con varias capas de sangre. F) Muestra sobresaturada.

Influencia del hematocrito en los DBS.

El hematocrito es la proporción del volumen de sangre que está ocupado por los glóbulos rojos o hematíes y es una característica fisiológica inherente al sujeto en el momento concreto de la extracción. Presenta diferencias notables entre distintas personas (coeficiente de variación interindividual de 6.4), aunque un mismo individuo suele mostrar modificaciones menos acusadas cuando no experimenta cambios fisiológicos bruscos (coeficiente de variación intraindividual de 2.8). Los valores normales del hematocrito en los adultos son de 0.41–0.51 para los hombres y de 0.37–0.47 para las mujeres [42], mientras que los neonatos presentan un rango mucho más amplio, entre 0.28–0.67.

Según las indicaciones del *European Bioanalysis Forum*, el hematocrito es el parámetro que tiene más influencia en la difusión de la sangre en el papel de filtro, lo que puede tener una incidencia importante en la validez de los resultados generados por los métodos basados en los *DBS*, ya que afecta a la formación del depósito, su tamaño, su homogeneidad, el tiempo de secado, y en definitiva, a la robustez y reproducibilidad del ensayo [8].

Puesto que al aumentar el hematocrito aumenta de forma directamente proporcional la viscosidad de la sangre, cuanto mayor sea aquél menor será la difusión de la muestra a través del papel y, por lo tanto, menor será la superficie del mismo ocupada tras la deposición de idéntico volumen de sangre. En este sentido, Denniff *et al*. han demostrado que el tamaño de los *DBS* sobre papel de celulosa decrecía proporcional y linealmente con el incremento en el nivel de hematocrito de la sangre [43].

Pero de estas experiencias no puede deducirse directamente que la concentración del analito por unidad de superficie aumente con el hematocrito, pues hay otros factores que inciden en el proceso: la naturaleza del analito, su distribución entre el suero y los hematíes, el tipo de papel utilizado como soporte y el procedimiento de lixiviación. Con esta conjunción de factores, aunque la mayoría de las publicaciones sobre los *DBS* abordan la cuestión del hematocrito variable de las muestras de sangre e incluso algunas de ellas están dedicadas casi exclusivamente a ese tema [44-47], no es de extrañar que los resultados obtenidos resulten contradictorios y no permitan obtener conclusiones de carácter general.

Así, simplemente como ejemplos, Holub *et al.* encontraron que la concentración de la mayoría de aminoácidos y acilcarnitinas medidos en los *DBS* se correlacionaban positivamente con un mayor hematocrito pero el efecto no era homogéneo y, además, para las sangres de menor hematocrito determinados aminoácidos mostraban una distribución no uniforme, con mayor concentración hacia la periferia del *DBS* [48]. Por el contrario, no se ha encontrado una asociación significativa entre el hematocrito y la concentración medida de 25-hidroxivitamina D_3 [49] o en la determinación de ciclosporina A [42].

Recientemente O'Mara *et al.* han realizado un estudio bastante exhaustivo sobre la influencia del hematocrito en la calidad de los resultados analíticos [36]. En su trabajo evaluaron distintos tipos de papel, tanto químicamente tratados (DMPK-A, antes Whatman FTA y DMPK-B, antes Whatman FTA Elute) como sin tratar (DMPK C, antes Whatman 31 EFT, y Ahlstrom 226), así como cinco compuestos distintos que presentaban un amplio rango de solubilidad en agua, lipofobicidad, potencial de ionización a pH fisiológico, capacidad de unión a las proteínas plasmáticas y propiedades de asociación con los glóbulos rojos. En todos los casos la concentración medida en discos troquelados del centro del *DBS* se incrementa con el aumento del hematocrito, aunque la magnitud del incremento es variable y parece estar determinado por el compuesto concreto y el papel utilizado.

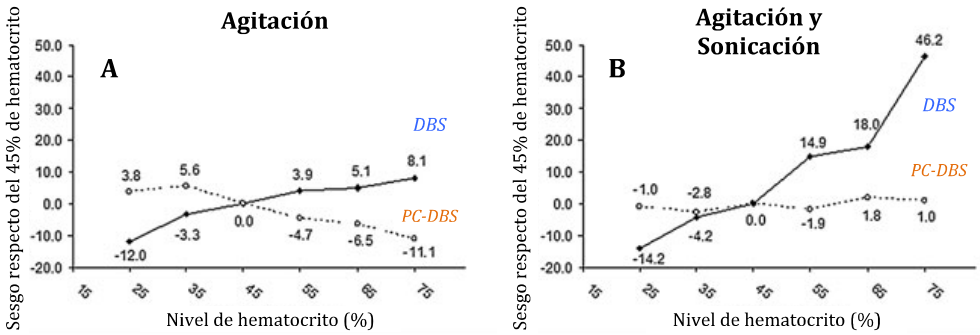
Si en lugar de troquelar el *DBS* se prosiguiera el proceso analítico con la totalidad del mismo, deberían desaparecer algunos de los problemas asociados con el hematocrito

(extensión en el papel de filtro de la muestra depositada, homogeneidad del analito en la misma), pues no es necesario que se produzca una distribución reproducible y homogénea de la sangre, ya que se analizará la totalidad de la misma. Dos trabajos recientes de Youhnovski *et al.* [50] y de Li *et al.* [51] exploran esta posibilidad utilizando *DBS precortados* (*Precut-DBS o PC-DBS*), que son simplemente discos blancos de papel de filtro troquelados (en los dos trabajos de unos 6 mm de diámetro) sobre los que se deposita un volumen perfectamente conocido de sangre (5 µL en ambos casos), que queda completamente retenido en el *PC-DBS* y con el que se continua el proceso analítico.

Al margen de que la necesidad de medir con exactitud el volumen de sangre depositado complica la toma de muestra y, por lo tanto, limita de forma considerable la utilización práctica de los *DBS*, los citados trabajos ilustran otro aspecto de la influencia del hematocrito en los *DBS*, su inciencia en el proceso de lixiviación.

Así, Youhnovski *et al.* [50] midieron la concentración de naproxeno en los *DBS* tras la extracción con metanol, tanto en discos de 3 mm de diámetro troquelados a partir de *DBS* convencionales como en *PC-DBS* de 6.1 mm de diámetro. Efectivamente, el diámetro del depósito de sangre formado decrecía al aumentar el hematocrito, pero al realizar la determinación del analito en las diversas condiciones, obtuvieron resultados paradójicos. Como puede observarse en la Figura I.6.A, si se realiza la lixiviación de forma convencional (agitación), al aumentar el hematocrito el valor obtenido a partir de los *DBS* aumenta (mayor concentración debida a la menor superficie de la mancha original) pero la obtenida a partir de los *PC-DBS* disminuye cuando la previsión era que permaneciera constante.

Figura I.6. Desviación del contenido en naproxeno en *DBS* y *PC-DBS* obtenidos usando papel DMPK-C en función del hematocrito.



A) Lixiviación mediante la agitación con un vórtex y luego manteniendo el disco en la disolución de extracción durante una hora. B) Lixiviación mediante agitación con un vórtex seguido de sonicación durante una hora.

Los autores argumentan que estos resultados se deben a que cuanto mayor es el hematocrito, el naproxeno está más retenido por la matriz y, por lo tanto, conduce a una peor recuperación en el proceso de lixiviación. En efecto, como puede verse en la Figura I.6.B, si se realiza una lixiviación más enérgica (por agitación y sonicación), al aumentar el hematocrito se produce un incremento mucho mayor del naproxeno medido en los *DBS*, mientras que en los *PC-DBS* permanece prácticamente constante.

Unas conclusiones similares se extraen del trabajo de Li *et al.* en su estudio de la determinación de lansoprazol [51]. Incidentalmente, a la vista de estos datos, se puede señalar que los resultados del interesante estudio de O'Mara *et al.* comentado anteriormente [36] deben matizarse por el hecho de que el procedimiento de medida (combustión del disco troquelado y medida del ^{14}C) no incluía ningún proceso de lixiviación.

Con la información existente se puede concluir que el hematocrito puede producir en las determinaciones realizadas sobre los *DBS* un efecto difícilmente previsible, ya que puede depender de las características del analito, de su distribución entre el suero y los hematíes, del papel utilizado y del procedimiento analítico desarrollado. En consecuencia, el *European Bioanalysis Forum* recomienda que para validar un método utilizando los *DBS*, debe estudiarse y documentarse previamente la incidencia en el mismo de la variación del hematocrito entre los valores clínicamente relevantes, es decir, desde 0.30/0.35 hasta 0.55/0.60 e incluso fuera de este rango cuando se trabaje con poblaciones especiales (pacientes con insuficiencia renal, pacientes oncológicos, etc.) [8].

Deposición de orina.

A diferencia de lo comentado para la sangre, la forma de añadir orina a un papel de filtro para la formación de un *DUS* no está estandarizada. Esta situación debería cambiar si se generaliza la recogida de orina sobre papel de filtro en los programas de cribado neonatal, tal como se realiza en la actualidad, en el caso de España, en Galicia y Murcia. De forma general, y en comparación con los *DBS*, la deposición de la orina sobre papel de filtro presenta las siguientes dificultades adicionales:

1) Aunque para los pacientes con control de la micción la deposición de orina en el papel de filtro es más sencilla y menos agresiva que la de la sangre, resulta problemática en el caso de recién nacidos y de pacientes incapacitados sin control de las funciones fisiológicas.

2) La menor viscosidad de la orina hace que ésta difunda más libremente en el papel de filtro, de forma que un determinado volumen de orina ocupa una superficie de papel sensiblemente mayor que el mismo volumen de sangre. En consecuencia, la cantidad de los analitos por unidad de superficie será menor, lo que puede generar problemas de sensibilidad.

3) La citada mayor difusión puede propiciar fenómenos cromatográficos y, en consecuencia, generar una distribución no homogénaea del analito en la superficie empapada de papel.

Aunque en ausencia de un procedimiento estandarizado los distintos trabajos publicados han propuesto procedimientos de deposición de orina adapatados a sus necesidades específicas (control y periodo de la recogida, sensibilidad analítica, etc.), todos ellos siguen respondiendo a las dos formas generales de deposición de las muestras sobre el papel de filtro (volumen conocido o desconocido) citadas anteriormente. Al margen de algún trabajo que utiliza una metodología idéntica a la de los *DBS* [52], en comparación con la deposición de sangre se pueden apreciar las siguientes diferencias:

a) Si se adiciona un volumen desconocido de orina, en lugar de adicionar una gota, se suele empapar completamente un trozo de papel de filtro de tamaño conocido [12,53-56].

b) Si se depone un volumen conocido de orina, suele hacerse sobre una superficie de papel también definida y tras realizar estudios que aseguran que dicha superficie es capaz de retener la totalidad de orina depositada [13,57-59].

De forma análoga a como se trabaja con los *DBS*, si se depone un volumen desconocido de orina es necesario troquelar el *DUS* resultante, mientras que si el volumen es conocido es frecuente proseguir el proceso analítico con la totalidad del *DUS*.

Para solventar problemas de sensibilidad, en algunos trabajos se propone utilizar papel de filtro de mayor tamaño [58] o, mejor, el uso de papeles de filtro de mayor grosor [53], como el papel cromatográfico 3MM CHR de Whatman [55].

La forma más sencilla de obtener la muestra de orina en el caso de los pacientes sin control de la micción es a partir de la contenida en los pañales. Ya en 1988, Kinoshita *et al.* propusieron un protocolo para recién nacidos consistente en que los padres vertieran la orina recogida en el pañal sobre el papel de filtro y lo secaran rápidamente [53].

Un sistema todavía más fácil consiste en la introducción del papel de filtro en el interior del pañal. Aunque con esta forma de preparación de los *DUS* se ha reseñado un pequeño porcentaje de casos de irritaciones menores de piel y, excepcionalmente, alguno de reacciones perianales severas, parece ser que las causas más probables de las mismas provienen de colocar el papel de filtro directamente sobre la piel, en vez de en el interior del pañal, y dejar el pañal sin cambiar durante un periodo de tiempo excesivo [56].

Dado que la orina se repartirá entre el pañal y el papel de filtro, cabe la posibilidad de que el uso de pañales de diferentes fabricantes (con distinta capacidad de absorción) pueda modificar la retención del analito en el papel de filtro. En este sentido, Barbas *et al.* analizaron diversos ácidos orgánicos en orina mediante electroforesis capilar, utilizando *DUS* preparados introduciendo el papel de filtro dentro del pañal de recién nacidos. Para ello utilizaron pañales de tres marcas y dos tipos de papel de filtro diferentes, sin encontrar diferencias significativas en la recuperación de los analitos [54].

I.2.2. Conservación de los *DMS*.

Ya se ha indicado anteriormente que la facilidad de la conservación y transporte de los *DMS* constituye una de las ventajas de la deposición de muestras biológicas sobre papel de filtro y varios trabajos han demostrado las ventajas de los *DBS* para preservar a algunos metabolitos inestables de la degradación o, al menos, para retardar este proceso [60,61]. Asimismo, Redondo *et al.* han propuesto el uso de *DUS* para proteger el etilglucurónido de la degradación bacteriana por acción de las bacterias con actividad β-glucuronidasa, que se produce rápidamente en muestras líquidas de orina a no ser que se mantenga refrigerada [62].

En la mayoría de los casos los *DBS* se pueden conservar a temperatura ambiente, aunque para algunos de los analitos puede requerirse una temperatura más baja con objeto de prolongar su estabilidad. De forma general, cuando se pretenden periodos muy largos de conservación o se trabaja con analitos inestables, se han sugerido temperaturas de conservación de -20 a -60 ºC [25,27,42,49,61,63-65]. Por ejemplo, las acilcarnitinas son inestables, debido a su hidrólisis, si se conservan a temperatura ambiente durante más de dos semanas pero son estables durante al menos 330 días si se almacenan a -18 ºC [66]. Los estudios sobre la estabilidad de la muestra en función del tiempo y de la temperatura de almacenamiento han sido revisados por Li y Tse [6].

Son pocos los trabajos que han estudiado la conservación de los *DBS* a temperaturas superiores a la ambiental, pudiendo citarse alguno a 40 - 45 ºC [40,61,67,68] e incluso a 70 ºC [38]. El interés de estos estudios no es meramente académico pues aunque muchos investigadores han indicado que los *DBS* puedan enviarse por correo ordinario [66], existe un informe de la *Food and Drug Administration* advirtiendo que la temperatura dentro de paquetes de correo puede alcanzar los 60 ºC [10].

La influencia de la humedad sobre la estabilidad en los *DBS* de distintos marcadores utilizados habitualmente en el cribado neonatal, aminoácidos y acilcarnitinas [69] o

hemoglobinas [70], ha sido estudiada recientemente por Adam *et al*., con la conclusión previsible de que una elevada humedad favorece la degradación de la mayoría de los analitos.

Para los casos en que sea necesario extender el periodo de estabilidad de un compuesto en los *DMS*, se pueden seguir tres mecanismos distintos que además son compatibles:

1) Disminuir la temperatura, ya que se espera que la reacción de degradación (reducción, oxidación o hidrólisis) será 10 veces más lenta al disminuir la temperatura de 22 a 0 ºC [71].

2) Mantener una baja humedad relativa, ya que ésta tiene un papel crítico en las reacciones de hidrólisis, químicas o enzimáticas [60]. Para ello es conveniente secar completamente el papel, reponer el desecante en los contenedores e incluso hacer el vacío en los mismos.

3) Utilizar papeles de filtro pretatados químicamente tal como se ha indicado en el Apartado I.1.2 aunque, a diferencia de los mecanismos anteriores, en este caso hay que realizar un estudio específico para cada situación.

Por último, resulta importante recordar que, pese a las dificultades comentadas, la metodología de los *DMS* no presenta más problemas de estabilidad que la forma de trabajo convencional. Al contrario, como se comenta en el documento del *European Bioanalysis Forum*, existen múltiples ejemplos sobre un significativo incremento de estabilidad cuando se utilizan los *DBS* con respecto a los ensayos líquidos tradicionales [8].

I.2.3. Troquelado de los *DMS*.

Como se ha comentado anteriormente, la forma más habitual de obtener resultados cuantitativos a partir de los *DMS* se basa en que que la cantidad de muestra contenida por unidad de superficie de papel de filtro es constante. Por lo tanto, el proceso analítico debe realizarse con una superficie definida del *DMS* lo que se consigue troquelando el mismo. Por otra parte, el uso de superficies reducidas puede facilitar el proceso de lixiviación.

El proceso de troquelado consiste en realizar un agujero en el *DMS* utilizando una pieza con bordes afilados que al ser presionada sobre el papel le provoca un corte de las dimensiones adecuadas. Los troqueladores más sencillos son simples dispositivos manuales que se utilizan para realizar agujeros en papel y que permiten presionar el cabezal cortante con dos dedos de la mano, de forma que el disco troquelado se deja caer, normalmente, sobre un tubo *eppendorf*.

Sin embargo, los laboratorios clínicos analizan rutinariamente cientos de *DBS* al día (y por lo tanto, deben realizar cientos de troqueles) por lo que disponen de equipos automatizados. Estos incluyen el *software* adecuado para que una vez colocada la tarjeta con el *DBS* debajo del cabezal, al presionar un pulsador, se dispare el cabezal cortante que realiza el troquel; el disco troquelado cae directamente sobre un pocillo de una placa de microtitulación, que es donde habitualmente se realiza el proceso de lixiviación. Inmediatamente después, el soporte de la placa se mueve para situar el siguiente pocillo vacío debajo del cabezal.

Estos dispositivos disponen también de lectores ópticos de forma que, al mismo tiempo que se realiza el troquel, se produce la lectura del código de barras de la tarjeta que se está troquelando y esta información se transmite a los equipos de análisis para la identificación inequívoca de la muestra que ha caído en cada uno de los pocillos.

En general, para las distintas aplicaciones clínicas se han estandarizado los tamaños de los discos troquelados a tres diámetros diferentes: 3.2, 4.7 y 6.0 mm. Sin embargo, como una novedad, Perkin Elmer ha comercializado recientemente un nuevo equipo (*Panthera-Puncher 9*) que permite acoplar un cabezal que proporciona discos de 1.5 mm de diámetro, lo que permite desarrollar métodos de análisis con *DBS* preparados con menores volúmenes de sangre.

Efectos cromatográficos del papel de filtro.

Un importante problema potencial que presenta la metodología de los *DMS* es la posibilidad de que se produzcan efectos cromatográficos en la difusión de la muestra líquida sobre el papel de filtro ya que en este caso, porciones troqueladas en distintas partes del *DMS* contendrían cantidades diferentes de analito. Evidentemente, si el procedimiento de medida utiliza la totalidad del *DMS*, la existencia de efectos cromatográficos es irrelevante.

La revisión de los trabajos que estudian la posible distribución inhomogénea del analito en los *DBS* resulta muy poco esclarecedora. Normalmente dichos estudios se centran en observar las diferencias entre los discos troquelados del centro del disco (donde se ha realizado la deposición de la muestra) respecto de otros troquelados en la periferia del mismo y, en la actualidad, los resultados no permiten obtener conclusiones de validez general.

Por ejemplo, según los trabajos de Mei *et al*., del *The Newborn Screening Quality Assurance Programme*, los discos obtenidos del centro del *DBS* retenían un volumen de sangre ligeramente mayor que los discos troquelados en la periferia, aunque las diferencias eran inferiores al 2%, es decir, irrelevantes [4]. En trabajos relativamente recientes, El-Hajjar *et al.* encontraron la misma concentración de plomo en toda el área del *DBS* (excepto el borde de la misma) [72] y Liang *et al.* tampoco hallaron diferencias en la concentración de dextrometorfano y dextrorfano [26]. Por el contrario, Holub *et al.* indicaron que el impacto del efecto cromatográfico podía ser pronunciado para algunos aminoácidos y acilcarnitinas en muestras con bajo hematocrito [48].

En todo caso, los resultados puntuales discrepantes tampoco deben considerarse extraños si se tiene en cuenta que sobre un *DBS* se pueden determinar una gran variedad de analitos, con características muy diferentes (tamaño, grado de unión con otros componentes de la sangre, etc.). En estas condiciones, probablemente no sea razonable esperar que el comportamiento de todos los analitos en su migración a través del papel de filtro sea idéntica.

Frente a esta información dispersa, parecen más interesantes dos trabajos recientes que se centran en el comportamiento de diferentes marcas de papel de filtro. O'Mara *et al.* [36] evaluaron la distribución de varios analitos dentro del *DBS*, midiendo la radioactividad en discos troquelados del centro y de la periferia, para distintos tipos de papel con y sin pretratamiento químico: los Whatman DMPK C y Ahlstrom 226 (ahora, Perkin Elmer 226) no pretratados y los Whatman FTA (ahora, DMPK-A) y Whatman FTA Elute (ahora, DMPK-B), pretratados. Los resultados de este trabajo se presentan en la Tabla I.1.

Tabla I.1. Relación entre las señales obtenidas en el centro y en la periferia del *DBS* para disntintos analitos en diferentes papeles [36].

Características fisicoquímicas				Relación perímetro / centro (media, n=4)			
Compuesto				Papel			
	% Unión a proteínas plasmáticas	Distribución sangre/ plasma	pKa	Ahlstrom 226	Whatman FTA	Whatman FTA Elute	Whatman DMPK-C
Acetaminofeno	24	0.6	9.9	1.17	1.11	0.93	1.09
GSK1*	55	0.9	8.6	1.22	1.07	0.94	1.23
GSK2*	80	1.0	4.5	1.25	1.02	0.98	1.18
GSK3*	99.3	0.5	8.4, 12.4	1.46	1.07	0.89	1.37
GSK4*	99.5	0.6	4.3	1.40	1.17	0.99	1.40

* Compuestos estudiados como posibles fármacos, cuya identidad no se revela.

De estos resultados parece deducirse que los efectos cromatográficos dependen más del tipo de papel que del compuesto estudiado, ya que tres de los papeles proporcionan relaciones centro/periferia superiores a la unidad en todos los casos (aunque la dispersión es elevada, con valores que oscilan entre 1.02 y 1.46), mientras que con el cuarto (Whatman FTA Elute) los valores son siempre inferiores a la unidad (y bastante cercanos a ésta). Además, para los dos papeles que presentan valores más alejados de la unidad, la magnitud de la desviación parece relacionarse con el porcentaje en el que el compuesto se une a las proteínas plasmáticas (GSK4 y GSK3 > GSK2 y GSK1 > acetaminofeno).

Un año antes, Ren *et al.* [73], en su estudio de cinco papeles de filtro, habían llegado también a la conclusión del distinto comportamiento de los mismos e indicado distribuciones no homogéneas en todos ellos, con niveles reducidos en los bordes y lo que denominaron un *efecto volcán* en el centro. Sin embargo, en este trabajo los papeles sin pretratamiento químico (Ahlstrom 226 y Whatman 903) mostraban, en todas las condiciones ensayadas, una mayor uniformidad y un menor *efecto volcán* que el Whatman FTA Elute, lo que resulta contradictorio con los resultados de O'Mara *et al*.

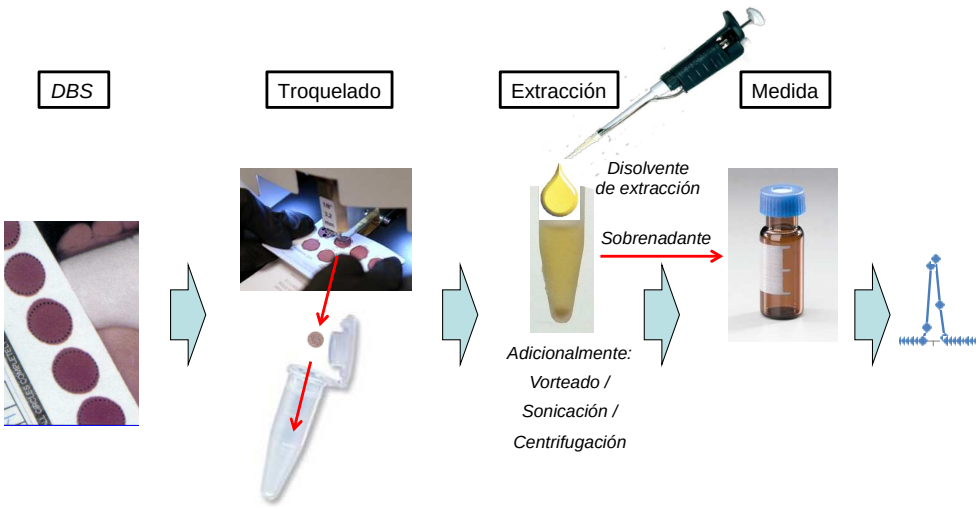
En todo caso, S. Tanna y G. Lawson reconocen en su revisión crítica que estos resultados parecen contradecir las expectativas existentes [10] y, en estas circunstancias, parece obligado seguir las indicaciones del *European Bioanalysis Forum*, que recomienda que cuando se desarrolle un método analítico, se evalúe la incidencia de este parámetro para el analito y papel concreto utilizado [8].

Si se pretende trabajar con matrices menos viscosas que la sangre (como, por ejemplo, la orina), es previsible que los problemas debidos a efectos cromatográficos se incrementen ya que al difundir más libremente la muestra sobre el papel de filtro ocupará una superficie mayor y, evidentemente, a mayor distancia recorrida mayor es el riesgo de la aparición de dichos efectos cromatográficos. Estos problemas quedan reflejados en el trabajo de Kumtabtim *et al*. que utilizaron la técnica de *LA-ICP-MS* para la determinación de elementos traza sobre *DUS* [74].

I.2.4. Lixiviación del analito.

Dado que la inmensa mayoría de las formas de obtener una señal analítica, especialmente si es con fines cuantitativos, implica la necesidad de que el analito se encuentre disuelto, una vez que se tiene preparado un *DMS*, la forma más habitual de trabajo es proceder a la lixiviación del analito. En la Figura I.7 se presenta un esquema típico de este proceso.

Figura I.7. Esquema de un proceso de lixiviación típico para el análisis de un *DBS*.



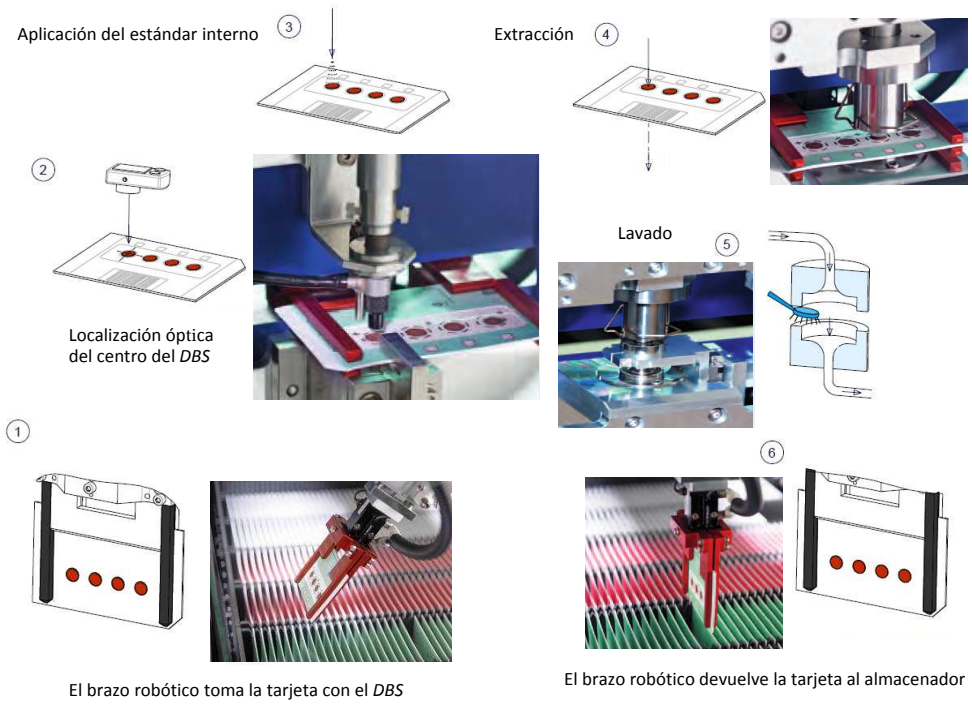
En esencia, se toma una porción definida del *DBS* (que se obtiene usualmente por troquelado y es necesario definirla para poder realizar la cuantificación del analito), se introduce en un tubo *eppendorf* o en un pocillo de una placa de microtitulación (como se representa en la Figura I.4) junto con un volumen adecuado del disolvente o mezcla de disolventes que resulten más adecuados para la lixiviación del analito, se somete a agitación durante el tiempo necesario y, en algunos casos, se mejora el proceso mediante centrifugación. Al disolvente de lixiviación se le pueden añadir sustancias que sean necesarias en otras fases del proceso analítico, tales como reactivos para la derivatización del analito (por ejemplo, para conseguir estabilidad térmica antes de una cromatografía de gases y para muchas determinaciones mediante fluorescencia molecular) o un patrón interno para facilitar el calibrado.

Dada la gran variedad de analitos que se pueden lixiviar desde un *DBS* el esquema anterior se modifica con cierta frecuencia: en bastantes procedimientos se incluye una etapa de sonicación por ultrasonidos para mejorar la eficiencia de la extracción y, en ocasiones, tras la centrifugación, se evapora la disolución y se reconstituye en un disolvente más adecuado para el ensayo que se pretenda realizar.

Idealmente el proceso de lixiviación debería llevar a que la totalidad del analito contenido en el trozo troquelado del *DMS* pasara a la disolución, lo que abriría el camino a realizar el calibrado con patrones disueltos sin necesidad de someterlos al mismo proceso analítico que los *DMS*. Desgraciadamente, numerosos estudios demuestran que no se produce la recuperación completa del analito y, en estas condiciones, el objetivo realista es conseguir una extracción reproducible del mismo sin ningún tipo de contaminación para realizar el calibrado con patrones emparejados.

Para facilitar el proceso están apareciendo en el mercado equipos comercializados para la manipulación de los *DBS*, que eliminan tanto la extracción manual como la necesidad de troquelar una porción del mismo. Un esquema básico de su funcionamiento se presenta en la Figura I.8 [75].

Figura I.8. Diagrama esquemático de las etapas para la lixiviación automatizada de los *DBS*.



Pese a estos avances el proceso de lixiviación continua siendo un paso crítico en el análisis de los *DMS* y la solución ideal sería realizar la medida del analito directamente desde aquél [76], lo que además supondría un importante ahorro de tiempo.

I.2.5. Identificación o determinación del analito.

Evidentemente, tras la lixiviación del analito del *DMS*, se utilizan los mismos métodos de determinación o identificación disponibles para el análisis de muestras disueltas, de forma que la técnica de los *DMS* se ha beneficiado, igual que las muestras convencionales, de los sucesivos desarrollos y mejoras de las técnicas analíticas.

Así, tras el citado trabajo de R. Guthrie y A. Susi [1], el desarrollo de las técnicas de radioinmunoensayo en los años 1970 hizo posible estudiar otras enfermedades, principalmente el hipotiroidismo congénito (midiendo la hormona tiroestimulante, TSH, y/o la tirotropina, T4) [77]. Un paso adelante en la simplificación de los procesos de determinación sobre *DBS* lo constituyó el desarrollo de métodos que no utilizaban isótopos radiactivos y, así, se utilizaron inmunoensayos para estudiar la fibrosis quística basados en la medida de la tripsina inmunoreactiva [78] o la hiperplasia suprarrenal congénita midiendo 17-hidroxiprogesterona [79].

En la actualidad la forma de medida más extendida comprende un proceso cromatográfico (con predominio de la cromatografía líquida sobre la de gases) y un sistema de detección que, en la mayoría de los casos, es un espectrómetro de masas. Asimismo hay que citar el análisis de amplificación de *DNA* mediante la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*), tanto para estudios de genética molecular, como para ensayos serológicos. En la Tabla I.2, adaptada del trabajo de S. Tanna y G. Lawson [10], y I.3, se presentan ejemplos representativos de los

sistema de medida más utilizados en la actualidad para realizar determinaciones sobre *DBS* y sobre *DUS*.

Tabla I.2. Ejemplos representativos de técnicas analíticas utilizadas en la actualidad para el análisis de los *DBS* (adaptada de [10]).

Método de análisis	Extracción y procesamiento de la muestra	Aplicación
Inmunoanálisis	Extracción del *DBS*	Cribado neonatal [78]
MS/MS	Troquelado del *DBS* y extracción (+estándar interno)	Cribado neonatal [80]
GC-MS	Adición del estándar interno sobre el *DBS*, troquelado completo del *DBS* de 50 µL y extracción + derivatización	Determinación de ácido gamma-hidroxibutírico [81]
GC-MS/MS	Troquelado completo del *DBS* de 10 µL, adición del estándar interno (5 µL) sobre el disco y extracción + derivatización	Monitorización de fármacos [82]
LC-UV	Extracción (+estándar interno) del *DBS* completo de 100 µL, centrifugado y concentrado del extrato mediante extracción en fase sólida (*SPE*)	Monitorización de fármacos [31]
LC-UV	Troquelado del *DBS* (disco de 6 mm de diámetro) y extracción (+estándar interno)	Monitorización de fármacos [83]
*LC-*Fluorescencia	Troquelado del DBS, extracción (+estándar interno) y derivatización	Monitorización de fármacos [84]
LC-MS	Troquelado del *DBS* y extracción (+estándar interno)	Monitorización de fármacos [85]
TLC-MS	extracción online automatizada	Cribado neonatal, monitorización de fármacos y estudios farmacocinéticos [86]
LC-MS/MS	Troquelado del *DBS* y extracción (+estándar interno)	Cribado neonatal, monitorización de fármacos y estudios farmacocinéticos [6]
DESI	Análisis directo	Cribado neonatal y monitorización de fármacos [28]
DART	Análisis directo	Monitorización de fármacos [87]
PS-MS	Análisis directo	Monitorización de tóxicos y fármacos [88,89]
PCR-DNA	Troquelado del *DBS* y extracción	Análisis genéticos y serológicos [90]
ICP-MS	Troquelado del *DBS* y extracción	Análisis elemental [91]

Tabla I.3. Ejemplos representativos de técnicas analíticas utilizadas en la actualidad para el análisis de los *DUS*

Método de análisis	Extracción y procesamiento de la muestra	Aplicación
TLC	Recogida de orina en pañal y empapado completo del papel de filtro. Troquelado de un disco de 5 cm y elución con 3 mL de disolución de NH_3.	Cribado neonatal [12]
HPLC-MS/MS	Recogida de orina en contenedor convencional y deposición de 1 mL en un papel de filtro de 5 cm de diámetro y secado. Deposición del estándar interno sobre el *DUS* y secado. Elución completa del *DUS* con 4 mL de metanol y agitación durante 1 hora.	Diagnóstico de metabolopatías [13,92,93]
HPLC-MS/MS	Recogida de orina en contenedor convencional y deposición de 200 µL en una tira de papel de filtro de 12x40 mm y secado. Deposición del estándar interno sobre el *DUS* y secado. Elución completa del *DUS* con 1.5 mL de metanol:agua (3:1) y sonicación durante 10 minutos.	Diagnóstico de metabolopatías [59]
HPLC-MS/MS	Recogida de orina en contenedor convencional y deposición de 30 µL en una tira de papel de filtro de 5 mm de ancho. Tras el secado, troceado del *DUS* y elución con 300 µL de de metanol (conteniendo los estándares internos) mediante vorteado durante 10 minutos y centrifugación.	Análisis de etilglucurónido (metabolito del etanol) [62]
HPLC-MS/MS	Recogida de orina en contenedor convencional y deposición de 75 µL en un papel de filtro. Troquelado de un disco de 3.2 mm de diámetro y elución del disco con disolución de extracción (conteniendo los estándares internos) mediante incubación a 60 ºC durante 45 minutos.	Análisis de ácidos orgánicos [52]
^{1}H NMR	Recogida de orina en contenedor convencional y empapado del papel de filtro de 3x2 cm con 2 mL de orina. Elución completa del *DUS* con 1.2 mL de D_2O y centrifugado.	Análisis de aminoácidos y ácidos orgánicos [55]
GC-MS	Recogida de orina en contenedor convencional y deposición de 0.4 mL en un papel de filtro de 20x50 mm. Elución completa del *DUS* con 0.4 mL de agua destilada y centrifugado.	Cribado neonatal [58,94]
GC-MS	Recogida de orina en contenedor convencional y deposición de 4 mL en un papel de filtro de 10x10 cm. Elución de un fragmento del *DUS* de 20 cm^2 con 5 mL de agua destilada y agitación mecánica.	Determinación de ácido orótico [57]
HPLC	Recogida de orina en pañal y empapado completo de un papel de filtro de 20x50 mm. Troquelado de un disco de 5 mm de diámetro y elución con 600 µL de una disolución de tartrato sódico 5 mM. Tratamiento con una termomix durante 5 segundos.	Cribado de neuroblastoma [53]
CE	Introducción del papel de filtro de 6x10 cm en el interior del pañal. Se corta una tira de 2x10 cm y se eluye con 3 mL de agua destilada con agitación mecánica durante 5 minutos y centrifugación.	Análisis de ácidos orgánicos [54]
PCR-DNA	Introducción de un papel de filtro de 2x5 cm en el interior del pañal. Troquelado de un disco de 3 mm de diámetro y elución con 200 µL de agua destilada.	Carga viral de citomegalovirus [56]
PS-MS	Análisis directo	Análisis de tóxicos y fármacos [95]

Determinaciones directas sobre el DMS.

Como se ha indicado anteriormente al comentar el proceso de lixiviación, la forma ideal de realizar las determinaciones sobre los *DMS* sería la medida directa del analito sobre el mismo, sin volver a ponerlo en disolución. Pero, pese a las innegables ventajas que supondría, esta forma de trabajo ha recibido hasta la fecha escasa atención.

Y eso a pesar de que pocos años después del trabajo pionero de R. Guthrie y A. Susi [1], Delves propuso la determinación de plomo en sangre contenida en un *DBS* sin proceso de lixiviación, mediante la denominada *copa de Delves* [96] que se comentará con más detalle en el Apartado I.3.2. Sin embargo, el método resultó muy controvertido y no logró asentarse en la práctica de los laboratorios clínicos.

La comercialización, ya dentro de este siglo, de instrumentos que permiten la ionización a temperatura y presión ambientales, en conjunción con la espectrometría de masas, parece abrir un campo muy prometedor para la determinación directa de muchos analitos en los *DMS*. En la actualidad se dispone comercialmente de dos variantes para estas técnicas: *DESI-MS* (*Desorption Electrospray Ionisation - Mass Spectrometry*) y *DART* (*Direct Analysis in Real Time*).

En el sistema *DESI*, el aerosol de un disolvente orgánico es dirigido hacia una superficie (por ejemplo, el *DMS*) en una corriente de nitrógeno y en un campo eléctrico de 4 kV. Las microgotas cargadas impactan con la superficie, disuelven alguno de los analitos y posteriormente son expulsadas como consecuencia de otros impactos y se pueden dirigir a la entrada de un espectrómetro de masas. El sistema *DART* utiliza un gas (helio, nitrógeno) previamente excitado mediante descarga eléctrica que, al incidir sobre la superficie del *DMS*, provoca la ionización de algunos analitos que son dirigidos al espectrómetro de masas. Estas técnicas ya se han utilizado para el análisis de *DBS*, especialmente para la determinación de compuestos de interés farmacéutico [28,87,97,98].

Hay que tener presente que en estos procedimientos no hay separación cromatográfica previa a la entrada en el espectrómetro de masas. En consecuencia, el procedimiento es más rápido pero pueden aparecer problemas de selectividad, por lo que a menudo se requiere un espectrómetro de masas de alta resolución o un espectrómetro *MS/MS*.

Calibrado.

Como ya se ha indicado reiteradamente, cuando se trabaja con los *DMS* el calibrado se realiza habitualmente mediante patrones emparejados, que se someten al mismo proceso analítico que las muestras de forma que se compensen diversas variables del proceso, muy especialmente un rendimiento incompleto en la lixiviación del analito.

En el caso de la sangre, una limitación importante de la técnica de los *DBS* es que la matriz del patrón de calibrado debe ser similar a la de la muestra para que los procesos de difusión y distribución de la sangre en el papel de filtro sean equiparables. Está ampliamente demostrado que patrones sintéticos o que hayan podido hemolizarse en su preparación muestran propiedades de difusión diferentes a los de la sangre total, de forma que no podrán utilizarse para obtener resultados cuantitativos cuando el análisis se realiza con un disco troquelado del *DBS* [4].

En este sentido, Czidziel demostró por microscopía de barrido electrónico que no existen hematíes en los *DBS* preparados a partir del material de referencia comercial Seronorm (material liofilizado que se reconstituye con agua destilada), de forma que este material tenía unas propiedades muy distintas a la sangre normal y no podía utilizarse para validar la determinación de plomo mediante *LA-ICP-MS* en un *DBS* [99].

Idealmente, los patrones de calibrado y las muestras de control deberían prepararse a partir de sangre fresca (extraída recientemente) y cubrir con seguridad el rango de concentraciones deseado; además, puede ser necesario ajustar los niveles de hematocrito para hacerlos equivalentes a los de las muestras. La forma más usual de trabajo consiste en preparar patrones emparejados (*matrix-matched standards*) mediante la adición a sangre

fresca exenta del analito de cantidades conocidas del mismo, usualmente disuelto en suero fisiológico.

Es muy importante que el analito se adicione en un volumen muy pequeño, de forma que las muestras reales y las dopadas sean lo más parecidas posible, pues de lo contrario pueden provocarse diferencias en la formación del *DBS*, en la distribución de los compuestos en el papel de filtro, en la hemólisis de la sangre antes de su aplicación al papel y en el tiempo de secado. Respecto a esta cuestión, el *European Bioanalysis Forum* indica que "la preparación de muestras dopadas para *DBS* …/… confronta al científico bioanalítico con un desafío adicional comparado con muestras de matriz líquida, particularmente cuando se usan pequeños volúmenes. …/… La homogeneidad de la muestra puede no ser adecuada cuando se manejan y mezclan pequeños volúmenes en las etapas de fortificación" [8].

Hay situaciones en las que no es posible disponer de una sangre fresca exenta del analito y, en estos casos, los patrones de calibrado deben prepararse mezclando glóbulos rojos lavados, con plasma o suero artificial dopado con los analitos en las concentraciones deseadas [100-102].

Aunque la orina es una muestra mucho menos compleja que la sangre y a que, en un trabajo algo antiguo, Kinoshita *et al.* realizaran el calibrado con papel de filtro impregnado de disoluciones acuosas del patrón [53], la tendencia es también el uso de patrones emparejados. Por ejemplo, en el trabajo de Barbas *et al.* sobre la determinación de diversos ácidos orgánicos en orina mediante electroforesis capilar se encontró que la recuperación de los analitos era distinta si se empapaba el papel de filtro directamente con estándares acuosos o con orina dopada [54].

Utilización de un patrón interno.

Puesto que muchos de los métodos analíticos desarrollados para realizar determinaciones sobre los *DBS* utilizan la espectrometría de masas como sistema de detección, el uso de un patrón interno puede suponer una mejora importante en los resultados obtenidos y constituye un tema de gran actualidad. El patrón interno debe ser, idealmente, un análogo estructural del analito a cuantificar (preferiblemente un análogo marcado isotópicamente estable), que se añade en una concentración igual a todas las muestras de cada uno de los ensayos, incluyendo los patrones de calibrado y las muestras de control. Esta medida, que debería ser la misma en todos los casos, sirve para compensar las fluctuaciones en la señal del analito causadas durante el proceso analítico (preparación de la muestra, respuesta del instrumento, etc.).

La forma más frecuente de incorporar el patrón interno consiste en añadirlo al disolvente usado para la lixiviación. El procedimiento es sencillo y ha demostrado ser reproducible pero, dado que el patrón interno no se ha sometido a los efectos de deposición, disfusión y secado de la muestra, ni está realmente incorporado a los componentes de la matriz y del papel en el proceso de lixiviación, no es capaz de compensar todas las fluctuaciones del analito durante el ensayo.

En esta situación, el *European Bioanalysis Forum* concluye que deberían considerarse y evaluarse otras técnicas de introducción el patrón interno en etapas anteriores del proceso analítico [8]. Abu-Rabie *et al.* [103] han abordado recientemente esta cuestión y han propuesto una nueva tecnología que permite automatizar la adición del patrón interno. Según estos autores, las cuatro posibilidades que existen para adicionar el patrón interno a un *DBS* durante el procedimiento de medida, son:

a) Incorporación del patrón interno en el disolvente de elución/extracción, con las ventajas e inconvenientes enunciadas anteriormente.

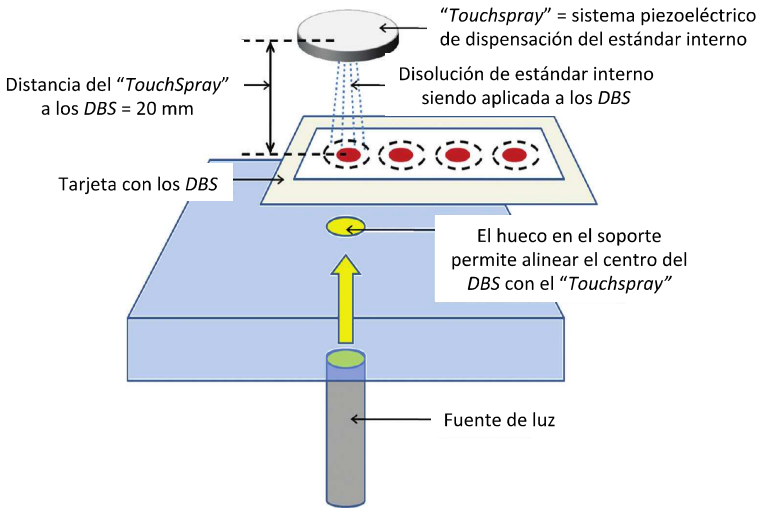
b) Pretratamiento del papel con el patrón interno. De esta forma se garantizaría la presencia del patrón interno en todo el proceso, excepto la deposición de la muestra. Sin embargo, esta técnica resulta impracticable cuando hay que tratar con múltiples estudios, centros y/o compuestos, si se desea mantener el bajo coste y la sencillez operativa que se espera de los *DBS*.

c) Adición del patrón interno a la muestra biológica en el centro de extracción, antes de su deposición sobre el papel. De esta forma se solventaría la única carencia analítica del procedimiento anterior pero, además de los problemas apuntados en éste, complicaría el procedimiento en el sitio de obtención de la muestra con lo que esta operación se aleja de la facilidad asociada a la técnica de los *DBS*.

d) Aplicación del patrón interno al *DBS* antes de la extracción. La adición de patrón interno al *DBS* se realiza en el laboratorio antes de la lixiviación, pero *no inmediatamente* antes de la misma, de forma que tenga el tiempo suficiente para unirse a los componentes de la matriz y al sustrato del papel. De esta forma se debería mejorar la integración del patrón interno en la muestra si se compara con el primer procedimiento citado. Se trata realmente de una solución de compromiso entre las anteriores propuestas.

Según los autores, la última opción es la única solución que ofrece una mejora en la actuación del patrón interno a la vez que mantiene la sencillez procedimental inherente a la tecnología de los *DBS*. La técnica ideal debería involucrar la aplicación homogénea de la disolución del patrón interno en toda la superficie y profundidad del *DBS* para asegurar su completa interacción con los componentes de la matriz y del papel, de una forma similar al analito. Además, la aplicación del patrón interno no debería causar ningún efecto cromatográfico significativo que afecte la concentración o distribución del analito en el *DBS*. Para la adición del patrón interno sobre el *DBS*, estos autores han propuesto la técnica del *spray* piezoeléctrico (*piezo electric spray technology*), que se representa esquemáticamente en la Figura I.9.

Figura I.9. Esquema de adición del patrón interno mediante la técnica del *spray* piezoeléctrico.



Sin embargo, ni siquiera esta metodología está libre de dificultades ya que es necesario establecer un compromiso en el volumen de disolución de patrón interno a utilizar: por un lado debe ser suficiente para lograr una cobertura homogénea y completa del papel (tanto en superficie como en profundidad) y, por otro, no ser tan elevado como para provocar efectos

cromatográficos debido a una cantidad excesiva de líquido que pudiera promover una redistribución de los analitos dentro del *DBS*.

Lo expuesto anteriormente para los *DBS* es extrapolable en sus aspectos generales para los *DUS* con los que, esencialmente, se siguen las mismas estrategias de adición del patrón interno: sobre la orina seca en el papel de filtro [13,57,59], con el disolvente de la lixiviación [62] o sobre el eluato una vez realizada la lixiviación [57,58,94]. Las ventajas e inconvenientes de cada método son las mismas apuntadas para los *DBS*.

I.3. Determinaciones elementales con los *DMS*.

La importancia de muchos elementos para el correcto funcionamiento del cuerpo humano es sobradamente conocida [104] y, en consecuencia, su determinación en fluidos y tejidos corporales es una tarea frecuente en los laboratorios clínicos [105]. En estas condiciones resulta sorprendente que la determinación de metales u otros elementos traza sobre los *DMS* apenas se utilice y que el número de publicaciones que abordan esta temática sea ciertamente escaso, tal como se aprecia en la Tabla I.4.

Tabla I.4. Determinaciones elementales sobre los *DMS*.

Analito	Soporte	Técnica	Observaciones	Ref.
Pb	*DBS*	*AAS* (llama)	Medida directa con la *copa de Delves*.	[96]
Pb	*DBS*	*AAS* (llama)	Medida directa con la *copa de Delves*.	[106]
Pb	*DBS*	*AAS* (llama)	Modificación del método de Delves por calcinación previa del papel.	[107]
Pb	*DBS*	*GF-AAS*	Lixiviación con $(NH_4)_2HP_4$ y Triton X-100.	[108]
Pb	*DBS*	*AAS* (llama)	Medida directa con la *copa de Delves*.	[109]
Pb	*DBS*	*AAS* (llama)	Medida directa con la *copa de Delves*. Estudio intercentros.	[110]
Pb	*DBS*	*ICP-MS*	Lixiviación con HNO_3 y uso de itrio como patrón interno	[111]
Pb	*DBS*	*GF-AAS*	Lixiviación con HNO_3 y Triton X-100. Calibrado con patrones acuosos. Indica que el método no es cuantitaivo sino con fines de *screening*.	[112]
Pb	*DBS*	*GF-AAS*	Esencialmente similar al anterior con una ligera modificación del procesado del *DBS*.	[113]
Pb	*DBS*	*GF-AAS*	Propone la adición de EDTA a las disoluciones lixiviadoras.	[114]
Pb	*DBS*	*LA-ICP-MS*	Medida directa.	[99]
Pb-Hg-Cd	*DBS*	*ICP-MS*	Lixiviación con ácido clorhídrico (2%), 0.05% de 2-mercaptoetanol (0.05%) y L-cisteína (0.001%) y rodio e iridio como patrones internos.	[115]
Multi-elemental	*DBS*	*ICP-MS*	Lixiviación con HNO_3 al 5% (v/v) y Triton X-100.	[91]
Multi-elemental	*DUS*	*LA-ICP-MS*	Medida directa. Sin señal en los *DUS*, obtuvieron los resultados depositando la orina sobre teflón.	[74]

En esta tabla puede observarse que sólo la determinación de plomo sobre los *DBS* ha suscitado un cierto interés, probablemente por el serio problema de contaminación por este metal que existe en Estados Unidos.

Dentro de este número muy limitado de trabajos se pueden distinguir tres etapas. En la primera, en los años setenta del pasado siglo, se realizaban las medidas directamente sobre el *DBS* mediante *AAS* con atomización en llama y se basaban en el diseño de la *copa de Delves* que al requerir una instrumentación y forma de trabajo no convencional, tuvo escasa repercusión fuera del ámbito académico.

Veinte años después se produjo un relativo renacimiento del interés por este tema, conviviendo los métodos basados en la *copa de Delves* con otros que, tras lixiviar al analito,

hacían uso de instrumentación convencional, normalmente *GF-AAS*. Sorprendentemente, los trabajos de esta época resultaron sumamente polémicos entre defensores y detractores de la determinación de plomo sobre los *DBS* [17,110,116-123], lo que sin duda no contribuyó al desarrollo de la técnica.

Finalmente, los pocos trabajos realizados ya dentro de este siglo ofrecen como novedad la realización de determinaciones multielementales y el primer intento de realizar determinaciones sobre los *DUS*.

En todo caso, da la impresión de que la determinación de elementos sobre los *DMS* sigue suscitando recelos que han sido superados en la determinación de otros analitos. De hecho, en una reunión celebrada en 2007 en Estados Unidos sobre la medida de tóxicos en los *DBS* todavía se apuntaba que uno de los mayores desafíos para la medida de metales en los mismos es la cuantificación del volumen de sangre que existe en el disco obtenido a partir del troquel de un *DBS* [20].

I.3.1. Determinaciones elementales sobre los *DMS* tras lixiviar al analito.

Como ya se ha indicado, la mayor parte de los trabajos publicados se refieren a la determinación de plomo en la sangre depositada en un *DBS* y los aspectos específicos de los mismos se comentarán con más detalle en la introducción del Apartado III.1 de esta Memoria. Asimismo, aunque no se trate de determinaciones cuantitativas, se han desarrollado métodos de criba para el plomo basados en la metodología de los *DBS* que se comentarán en el Apartado II.2.

Fuera de estos trabajos, Chaudhuri *et al.* abordaron la determinación multielemental de plomo, mercurio y cadmio sobre algunos *DBS* procedentes de muestras recogidas y almacenadas del cribado neonatal. El procedimiento se basa en la medida mediante *ICP-MS* de la disolución obtenida tras la lixiviación de discos de 6.35 mm troquelados de los *DBS* y resultó moderadamente satisfactorio para el mercurio y el plomo, pero inadecuado para el cadmio [115].

Hay dos aspectos de este trabajo que merecen reseñarse como potenciales problemas en la determinación de elementos sobre los *DMS*. En primer lugar, señalan que los papeles blancos suministrados por el fabricante presentan una contaminación apreciable en estos elementos que, además, es dependiente del lote utilizado. Por otra parte, estos autores han encontrado una diferencia que debe considerarse sorprendente en el peso de los distintos discos troquelados, de forma que para veinte discos blancos, troquelados de papel de filtro Whatman 903, lote W-011, los pesos de los mismos presentan unos valores extremos de 2.9 mg y 8.7 mg. Aunque en el trabajo no se indica la variabilidad del peso de los discos con sangre, los datos anteriores resultan poco alentadores para la reproducibilidad de un método cuantitativo.

El problema de la variabilidad de los *blancos* para muchos elementos, cuando se utilizan distintos lotes de papel, también se cita en el trabajo de Langer *et al.* dedicado a la determinación multielemental sobre los *DBS* mediante *ICP-MS* tras lixiviación con una mezcla de ácido nítrico y tritón X-100 [91]. Además, estos autores indican que, al restar el *blanco*, existen diferencias según que éste se tome como la media de la señal obtenida con una serie de papeles no sometidos al proceso analítico, o como la señal obtenida de un disco sin sangre pero troquelado cerca de la zona ocupada por la gota de sangre seca.

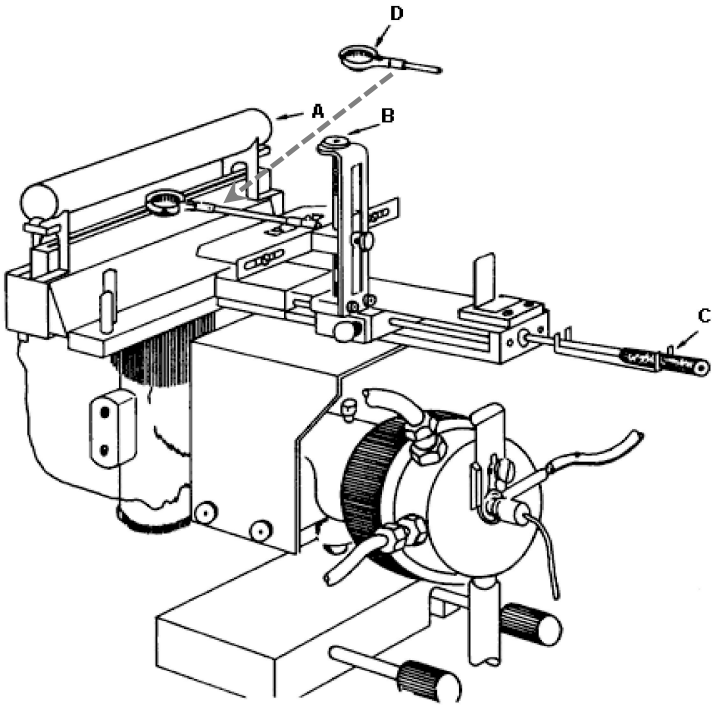
Finalmente se puede reseñar el trabajo de Kumtabtim *et al*. como el único intento conocido de realizar determinaciones elementales sobre *DUS*. Pero la extensa difusión de la orina sobre el papel de filtro hacía que la concentración de los analitos fuera tan baja que no pudieron ser medidos mediante *LA-ICP-MS*. Estos investigadores lograron realizar las medidas sustituyendo el papel de filtro por una superficie de teflón [74].

I.3.2. Determinaciones elementales directas sobre los *DMS*.

En el Apartado I.2 se ha comentado que realizar la medidas directamente sobre los *DMS*, evitando el proceso de lixiviación, presenta las ventajas de una mayor sencillez y rapidez del procedimiento, así como soslayar posibles problemas en la recuperación del analito desde el *DMS*. Asimismo se ha señalado que esta forma de trabajo ha recibido, hasta el momento, escasa atención.

Curiosamente, pese a los pocos trabajos dedicados a las determinaciones elementales sobre los *DMS*, los primeros de ellos se realizaron de forma directa mediante *AAS* con atomización en llama, utilizando la denominada *copa de Delves* [96] cuyo funcionamiento se presenta en la Figura I.10. En esencia, la muestra se coloca en un microcrisol de níquel (*copa de Delves*) que se calienta en la llama y los vapores se reciben sobre un cilindro de cuarzo de unos 10 cm, en el que se produce el proceso de absorción.

Figura I.10. Esquema de la *copa de Delves* para la determinación de plomo en los *DBS*.



(A) Tubo de cuarzo; (B) Tornillo de ajuste vertical; (C) Mando de ajuste horizontal; (D) *Copa de Delves* con aro de soporte.

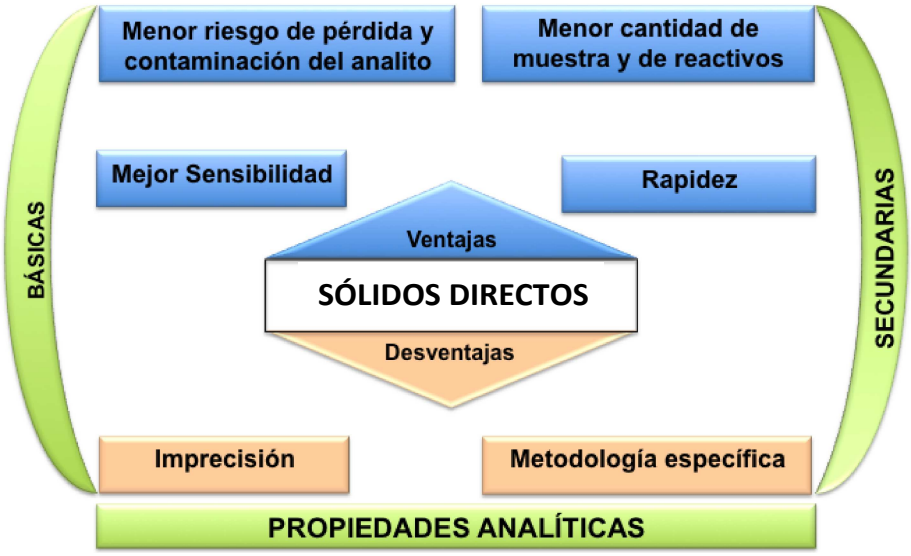
Como ya se ha indicado, ni este procedimiento, ni modificaciones posteriores al mismo [107], lograron una buena aceptación y, como puede verse en la Tabla I.4, los trabajos más recientes (excepto los basados en la ablación por láser) han vuelto a la forma de trabajo más convencional, con lixiviación del analito.

Ahora bien, la metodología de las determinaciones elementales directas a partir de muestras sólidas ha evolucionado mucho desde los tiempos de Delves.

El desarrollo de métodos basados en la absorción atómica fue artesanal durante muchos años, hasta que la comercialización de dispositivos específicos para las muestras sólidas propició una relativa eclosión de los mismos [124], de forma que en la última década del siglo pasado adquieren madurez los métodos basados en la vaporización electrotérmica de las muestras sólidas en horno de grafito con medida directa de la absorción atómica, o trasladando los vapores a un plasma de acoplamiento inductivo para realizar posteriormente la medida mediante emisión atómica o espectrometría de masas [125-127]. Más recientemente, la ablación mediante láser constituye otra alternativa a la vaporización electrotérmica para estos dos últimos tipos de medida [128].

Las ventajas e inconvenientes más importantes de estas técnicas en cuanto a las propiedades analíticas básicas y secundarias [129] de los procedimientos analíticos desarrollados con las mismas se resumen en la Figura I.11, adaptada del trabajo de Belarra *et al.* [130].

Figura I.11. Principales ventajas e incovenientes de las determinaciones elementales directas sobre muestras sólidas.



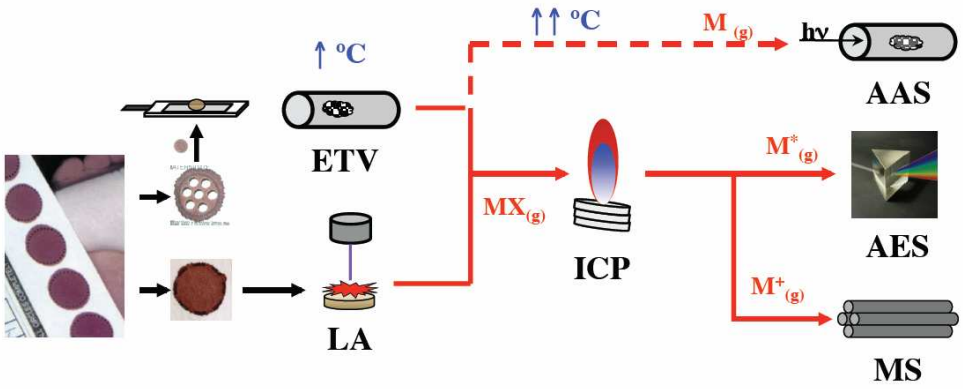
Mientras las ventajas de una mayor sensibilidad (que puede ser muy importante en el análisis de los *DMS*, especialmente de los *DUS* que parecen presentar serios problemas en este apartado) y el uso de una menor cantidad de muestra y de reactivos no tienen contrapartidas negativas, no sucede lo mismo en los otros casos.

En efecto, la eliminación de un posible sesgo por pérdida o incorporación del analito durante el tratamiento de la muestra tiene el contrapeso de una mayor imprecisión de los resultados. Aunque, con carácter general, esto se considera uno de los puntos más débiles de estos procedimientos, su importancia en el caso de las determinaciones elementales sobre los *DMS* sería sensiblemente menor si los resultados obenidos se utilizan simplemente como un sistema de criba.

En cuanto a las propiedades analíticas secundarias, la innegable rapidez en la obtención de resultados (aproximadamente 3-5 minutos para completar un proceso analítico) sólo se produce tras la optimización del procedimiento que, al utilizar una metodología específica de trabajo suele requerir más tiempo que si la muestra está disuelta. No obstante, al menos para los métodos basados en la vaporización de la muestra sólida en el horno de grafito, las líneas maestras de la metodología a utilizar están bien establecidas [130].

Trabajos recientes demuestran la utilidad de esta forma de trabajo en campos tan diversos como la determinación elemental directa en polímeros [131], material arqueológico [132], menas de metales preciosos [133] o diversas muestras biológicas [134-136]. Dado que muchas de estas matrices son bastante más complicadas que los *DMS*, no parece que haya ningún problema de carácter general que impida realizar determinaciones elementales directas a partir de éstos. En la Figura I.12 se presenta un esquema de las posibles formas de trabajo basadas en la vaporización electrotérmica o mediante ablación por láser.

Figura I.12. Esquema de posibles determinaciones elementales directas sobre los *DMS*.



Determinaciones directas mediante el método de gotas secas.

En los últimos años se ha desarrollado un procedimiento de trabajo que, aunque no hace uso de papel de filtro, guarda ciertas similitudes metodológicas con las determinaciones elementales directas sobre los *DMS*: la determinación elemental mediante *LA-ICP-MS* sobre las denominadas *gotas secas*, que son, simplemente, gotas o microgotas de una muestra líquida dejadas secar, usualmente con ayuda de una lámpara de luz infrarroja, sobre una superficie hidrófoba, como por ejemplo, poliestireno.

El *Institute for National Measurement Standard* de Ottawa publicó la determinación de níquel, cadmio y plomo en muestras acuosas mediante este procedimiento [137], que posteriormente fue utilizado por Hiesh *et al.* para realizar la determinación de plomo en sangre en un procedimiento que permitía realizar el calibrado con patrones acuosos [138].

Narukawa y Willie han realizado la determinación de elementos traza en residuos secos procedentes de la solubilización con ácido fórmico de tejidos biológicos. Consideran que una gran ventaja de este procedimiento es que junto con el el ácido fórmico se pueden agregar alícuotas acuosas de un estándar interno o de un patrón para el calibrado [139].

Más cercano al contenido de esta Memoria es el trabajo de Kumtabtim *et al.* (ya citado en la Tabla I.4) que han estudiado la posibilidad de determinar distintos elementos traza en orina, mediante la técnica de la *microgota seca*. Estudiaron distintos sustratos sobre los que depositar la gota (*Urine Kid paper*, papel Whatman 903, portaobjetos de vidrio y lámina de teflón) encontrando que el teflón era el más adecuado. Con los dos papeles de filtro se obtenían señales muy bajas, lo que parece justificado por la gran disusión de la orina en este soporte [74].

I.4. Objetivos del trabajo.

El objetivo básico de este trabajo es estudiar la posibilidad de realizar la determinación de metales en fluidos biológicos que se han depositado previamente en filtros clínicos. Como se ha comentado anteriormente, el uso de los *DMS* (especialmente los *DBS*) está teniendo un auge importante dentro del análisis clínico, pero la determinación de metales sobre los mismos, pese a su innegable interés clínico potencial, ha recibido muy poca atención.

Dado que este tipo de muestras, aunque son originariamente líquidas, tras su deposición en el papel clínico se transforman en muestras sólidas, se pretende utilizar las técnicas y la metodología para realizar determinaciones elementales directas sobre muestras sólidas, en las que el grupo de investigación en el que se va a desarrollar esta Tesis Doctoral lleva trabajando bastantes años. La utilización de dicha metodología debería permitir que las ventajas inherentes al uso de los *DMS* se incrementaran por el hecho de omitir el proceso de lixiviación del analito, lo que debe redundar en mejores prestaciones analíticas: mayor sensibilidad, menor riesgo de contaminación o pérdidas del analito y mayor rapidez y sencillez del proceso de medida.

Como desarrollo de este objetivo general se pretende alcanzar otros objetivos parciales referidos a las muestras, a los métodos y a los procedimientos.

Objetivos relacionados con las muestras.

Frente a la proliferación de procedimientos analíticos sobre los *DBS*, el número de los desarrollados sobre los *DUS* es muy reducido, pese a que la toma de orina es mucho menos invasiva para el paciente que la toma de sangre. En consecuencia, el objetivo más innovador que se propone en este campo es desarrollar métodos analíticos para la determinación de metales sobre los *DUS*, tema del que no existe ninguna referencia previa al inicio de esta Tesis.

Además, a la vista de la bibliografía que se ha generado en el campo de los *DMS* (especialmente los *DBS*) y que se ha comentado anteriormente, los procesos analíticos basados en los mismos presentan algunas características singulares que son motivo de controversia. Por lo tanto, en este trabajo se pretende estudiar en profundidad los siguientes aspectos del procedimiento, tanto para la sangre como para la orina: 1) influencia de la deposición de la muestra, especialmente la cantidad de la misma, en el papel clínico; 2) influencia del hematocrito en el caso de los *DBS*; 3) homogeneidad de la distribución del analito en los *DMS*; y 4) métodos de calibrado, con especial atención a la posibilidad de realizarlo con patrones acuosos

Objetivos relacionados con las técnicas.

Se pretende estudiar las prestaciones de varias técnicas atómicas para realizar estas determinaciones, atendiendo especialmente al carácter más o menos multielemental de las mismas, de forma que puedan atender los diferentes requerimientos que puedan darse en la práctica clínica. En este sentido se utilizarán las siguientes técnicas (ver la Figura I.12): 1) *GF-AAS* convencional con fuente de línea, como una técnica monoelemental, pero que es accesible en la práctica totalidad de los laboratorios clínicos; 2) *GF-AAS* de alta resolución con fuente continua (de reciente implantación, pero que por sus mejores prestaciones debería sustituir a la convencional), como una técnica polielemental que permite, bajo determinados supuestos, la determinación simultánea de unos pocos elementos; y 3) *LA-ICP-MS* como una técnica multielemental, adecuada para realizar la determinación simultánea de un número elevado de elementos, pero que todavía no puede considerarse de uso habitual en los laboratorios clínicos.

Las dos últimas técnicas, al permitir la medida simultánea de más de un elemento, posibilitan el uso de un patrón interno, por lo que se estudiará si su utilización consigue mejorar las prestaciones analíticas de los procedimientos desarrollados. Asimismo, se estudiarán otras ventajas importantes de la *GF-AAS* de alta resolución con fuente continua frente a la técnica tradicional con fuente de línea (por ejemplo, la corrección de interferencias y la extensión sencilla del rango lineal) que puedan aprovecharse en el contexto de las determinaciones elementales directas sobre los *DMS*.

Finalmente, dado que la técnica de *LA-ICP-MS*, además de su carácter multielemental ofrece la posibilidad de realizar análisis isotópico, se estudiará la posibilidad de utilizar esta característica para facilitar la detección precoz de algunas enfermedades que afecten al metabolismo de elementos esenciales, campo todavía muy poco explorado pero de importancia creciente.

Objetivos relacionados con los procedimientos.

En el campo del análisis clínico, cuando se pretende obtener información sobre una población elevada, son muy importantes los denominados métodos de *screening*, consistentes en un sistema de medida en dos etapas. En la primera de ellas, de criba, mediante un sistema rápido y sencillo se descarta a aquellos sujetos acordes con la normalidad (que se espera sean la mayoría) y en la segunda se utiliza un método cuantitativo convencional, más largo y costoso, únicamente sobre los restantes.

Aunque el objetivo básico de esta Tesis sea el desarrollo de métodos cuantitativos para la determinación de metales en los *DMS*, se estudiará la posibilidad de utilizar la metodología desarrollada, simplificándola si es posible, como primera etapa de un método de *screening* y se evaluarán las prestaciones de la misma.

I.5. Bibliografía.

[1] R. Guthrie, A. Susi. A simple phenylalanine method for detecting phenylketonuria in large populations of newborn infants. *Pediatrics*, 1963, 32, 338–343.

[2] I. Bang. The micro-methodology of blood sugar determination. *Biochem. Z.*, 1913, 57, 300–312.

[3] P.A. Demirev. Dried blood spots: analysis and applications. *Anal. Chem.*, 2013, 85, 779–789.

[4] J.V. Mei, J.R. Alexander, B.W. Adam, W.H. Hannon. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *J. Nutr.*, 2001, 131, 1631S–1636S.

[5] T.W. McDade, S. Williams, J.J. Snodgrass. What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography*, 2007, 44, 899–925.

[6] W. Li, F.L.S. Tse. Dried blood spot sampling in combination with LC-MS/MS for quantitative analysis of small molecules. *Biomed. Chromatogr.*, 2010, 24, 49–65.

[7] B.G. Keevil. The analysis of dried blood spot samples using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Clin. Biochem.*, 2011, 44, 110–118.

[8] P. Timmerman, S. White, S. Globig, S. Lüdtke, L. Brunet, J. Smeraglia. EBF recommendation on the validation of bioanalytical methods for dried blood spots. *Bioanalysis*, 2011, 3, 1567–1575.

[9] N. Spooner. A glowing future for dried blood spot sampling. *Bioanalysis*, 2010, 2, 1343–1344.

[10] S. Tanna, G. Lawson. Analytical methods used in conjunction with dried blood spots. *Anal. Methods*, 2011, 3, 1709–1718.

[11] H.K. Berry. Detection of metabolic disorders among mentally-retarded children by means of paper spot tests. *Am. J. Ment. Defic.*, 1962, 66, 555–560.

[12] C. Auray-Blais, D. Cyr, R. Drouin. Quebec neonatal mass urinary screening programme: from micromolecules to macromolecules. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2007, 30, 515–521.

[13] C. Auray-Blais, D. Cyr, K. Mills, R. Giguère, R. Drouin. Development of a filter paper method potentially applicable to mass and high-risk urinary screenings for Fabry disease. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2006, 30, 106–106.

[14] B. Rago, J. Liu, B. Tan, C. Holliman. Application of the dried spot sampling technique for rat cerebrospinal fluid sample collection and analysis. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2011, 55, 1201–1207.

[15] Y. Inoue, M. Ohse, T. Shinka, T. Kuhara. Prenatal diagnosis of propionic acidemia by measuring methylcitric acid in dried amniotic fluid on filter paper using GC/MS. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2008, 870, 160–163.

[16] Y. Inoue, M. Ohse. Prenatal diagnosis of methylmalonic aciduria by measuring methylmalonic acid in dried amniotic fluid on filter paper using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 400, 1953–1958.

[17] T.P. Moyer, D.N. Nixon, K.O. Ash. Filter paper lead testing. *Clin. Chem.*, 1999, 45, 2055–2056.

[18] J.C. Rockett, G.M. Buck, C.D. Lynch, S.D. Perreault. The value of home-based collection of biospecimens in reproductive epidemiology. *Environ. Health Perspect.*, 2004, 112, 94–104.

[19] P. Bhatti, D. Kampa, B.H. Alexander, C. McClure, D. Ringer, M.M. Doody, A.J. Sigurdson. Blood spots as an alternative to whole blood collection and the effect of a small monetary incentive to increase participation in genetic association studies. *BMC Med. Res. Methodol.*, 2009, 9, 76.

[20] A.F. Olshan. Meeting Report: The use of newborn blood spots in environmental research: opportunities and challenges. *Environ. Health Perspect.*, 2007, 115, 1767–1769.

[21] W.H. Hannon, R.J. Whitley, B. Davin, P. Fernhoff, T. Halonen, M. Lavochkin, J. Miller, J. Ojodu, B.L. Therrell. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Blood collection on filter paper for newborn screening programs; approved standard—fifth edition. CLSI document LA4-A5 (ISBN 1-56238-644-1). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007.

[22] Centers for Disease Control and Prevention. Newborn screening Quality Assurance Program. Annual summary report 2012. https://wwwn.cdc.gov/nsqap/public/default.aspx (last accessed 26-03-2014).

[23] P.M. Edelbroek, J. van der Heijden, L.M.L. Stolk. Dried blood spot methods in therapeutic drug monitoring: methods, assays, and pitfalls. *Ther. Drug Monit.*, 2009, 31, 327–336.

[24] J.V. Mei, S.D. Zobel, E.M. Hall, V.R. De Jesus, B.W. Adam, W.H. Hannon. Performance properties of filter paper devices for whole blood collection. *Bioanalysis*, 2010, 2, 1397–1403.

[25] M. Barfield, N. Spooner, R. Lad, S. Parry, S. Fowles. Application of dried blood spots combined with HPLC-MS/MS for the quantification of acetaminophen in toxicokinetic studies. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2008, 870, 32–37.

[26] X. Liang, Y. Li, M. Barfield, Q.C. Ji. Study of dried blood spots technique for the determination of dextromethorphan and its metabolite dextrorphan in human whole blood by LC-MS/MS. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2009, 877, 799–806.

[27] N. Spooner, R. Lad, M. Barfield. Dried blood spots as a sample collection technique for the determination of pharmacokinetics in clinical studies: considerations for the validation of a quantitative bioanalytical method. *Anal. Chem.*, 2009, 81, 1557–1563.

[28] J.M. Wiseman, C.A. Evans, C.L. Bowen, J.H. Kennedy. Direct analysis of dried blood spots utilizing desorption electrospray ionization (DESI) mass spectrometry. *Analyst*, 2010, 135, 720–725.

[29] I. Wilson. Global metabolic profiling (metabonomics/metabolomics) using dried blood spots: advantages and pitfalls. *Bioanalysis*, 2011, 3, 2255–2257.

[30] N. Ganz, M. Singrasa, L. Nicolas, M. Gutierrez, J. Dingemanse, W. Döbelin, M. Glinski. Development and validation of a fully automated online human dried blood spot analysis of bosentan and its metabolites using the Sample Card And Prep DBS System. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2012, 885-886, 50–60.

[31] D. Blessborn, S. Roemsing, A. Annerberg, D. Sundquist, A. Bjoerkman, N. Lindegardh, Y. Bergqvist. Development and validation of an automated solid-phase extraction and liquid chromatographic method for determination of lumefantrine in capillary blood on sampling paper. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007, 45, 282–287.

[32] G. Lawson, H. Mulla, S. Tanna. Captopril determination in dried blood spot samples with LC-MS and LC-HRMS: a potential method for neonate pharmacokinetic studies. *J. Bioanal. Biomed.*, 2012, 4, 16–25.

[33] J. van der Heijden, Y. de Beer, K. Hoogtanders, M. Christiaans, G.J. de Jong, C. Neef, L. Stolk. Therapeutic drug monitoring of everolimus using the dried blood spot method in combination with liquid chromatography-mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2009, 50, 664–670.

[34] G. Liu, Q.C. Ji, M. Jemal, A.A. Tymiak, M.E. Arnold. Approach to evaluating dried blood spot sample stability during drying process and discovery of a treated card to maintain analyte stability by rapid on-card pH modification. *Anal. Chem.*, 2011, 83, 9033–9038.

[35] Z. Zhang, W. Xu, N.E. Manicke, R.G. Cooks, Z. Ouyang. Silica coated paper substrate for paper-spray analysis of therapeutic drugs in dried blood spots. *Anal. Chem.*, 2012, 84, 931–938.

[36] M. O'Mara, B. Hudson-Curtis, K. Olson, Y. Yueh, J. Dunn, N. Spooner. The effect of hematocrit and punch location on assay bias during quantitative bioanalysis of dried blood spot samples. *Bioanalysis*, 2011, 3, 2335–2347.

[37] UK Newborn Screening Programme Centre. Guidelines for Newborn Blood Spot Sampling, February 2012. Department of Health of the UK. ISBN: 978-0-9562374-2-2. http:// www.newbornbloodspot.screening.nhs.uk (last accessed 26-03-2014).

[38] K. Hoogtanders, J. van der Heijden, M. Christiaans, P. Edelbroek, J.P. van Hooff, L.M.L. Stolk. Therapeutic drug monitoring of tacrolimus with the dried blood spot method. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2007, 44, 658–664.

[39] R. ter Heine, H. Rosing, E.C.M. van Gorp, J.W. Mulder, W.A. van der Steeg, J.H. Beijnen, A.D.R. Huitema. Quantification of protease inhibitors and non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors in dried blood spots by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2008, 867, 205–212.

[40] C.W.N. Damen, H. Rosing, J.H.M. Schellens, J.H. Beijnen. Application of dried blood spots combined with high-performance liquid chromatography coupled with electrospray ionisation tandem mass spectrometry for simultaneous quantification of vincristine and actinomycin-D. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, 394, 1171–1182.

[41] B.W. Adam, J.R. Alexander, S.J. Smith, D.H. Chace, J.G. Loeber, L.H. Elvers, W.H. Hannon. Recoveries of phenylalanine from two sets of dried-blood-spot reference materials: prediction from hematocrit, spot volume, and paper matrix. *Clin. Chem.*, 2000, 46, 126–128.

[42] A.J. Wilhelm, J.C.G. den Burger, R.M.V.A. Chahbouni, A. Sinjewel. Analysis of cyclosporin A in dried blood spots using liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2009, 877, 1595–1598.

[43] P. Denniff, N. Spooner. The effect of hematocrit on assay bias when using DBS samples for the quantitative bioanalysis of drugs. *Bioanalysis*, 2010, 2, 1385–1395.

[44] J.J. Orsini, J. Yeman, O.A. Bodamer, A. Mühl, M. Caggana. Semi-quantitative method for determination of hematocrit in dried blood spots, using data collected in HPLC hemoglobin variant testing. *Clin. Chim. Acta*, 2010, 411, 894–895.

[45] L. Fan, J.A. Lee. Managing the effect of hematocrit on DBS analysis in a regulated environment. *Bioanalysis*, 2012, 4, 345–347.

[46] R.A. Koster, J.-W.C. Alffenaar, B. Greijdanus, D.R.A. Uges. Fast LC-MS/MS analysis of tacrolimus, sirolimus, everolimus and cyclosporin A in dried blood spots and the influence of the hematocrit and immunosuppressant concentration on recovery. *Talanta*, 2013, 115, 47–54.

[47] S. Capiau, V.V. Stove, W.E. Lambert, C.P. Stove. Prediction of the hematocrit of dried blood spots via potassium measurement on a routine clinical chemistry analyzer. *Anal. Chem.*, 2013, 85, 404–410.

[48] M. Holub, K. Tuschl, R. Ratschmann, K.A. Strnadova, A. Muehl, G. Heinze, W. Sperl, O.A. Bodamer. Influence of hematocrit and localisation of punch in dried blood spots on levels of amino acids and acylcarnitines measured by tandem mass spectrometry. *Clin. Chim. Acta*, 2006, 373, 27–31.

[49] M.S. Newman, T.R. Brandon, M.N. Groves, W.L. Gregory, S. Kapur, D.T. Zava. A liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for determination of 25-hydroxy vitamin D2 and 25-hydroxy vitamin D3 in dried blood spots: a potential adjunct to diabetes and cardiometabolic risk screening. *J. Diabetes Sci. Technol.*, 2009, 3, 156–162.

[50] N. Youhnovski, A. Bergeron, M. Furtado, F. Garofolo. Pre-cut dried blood spot (PCDBS): an alternative to dried blood spot (DBS) technique to overcome hematocrit impact. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2011, 25, 2951–2958.

[51] F. Li, J. Zulkoski, D. Fast, S. Michael. Perforated dried blood spots: a novel format for accurate microsampling. *Bioanalysis*, 2011, 3, 2321–2333.

[52] O.Y. Al-Dirbashi, S. Kölker, D. Ng, L. Fisher, T. Rupar, N. Lepage, M.S. Rashed, T. Santa, S.I. Goodman, M.T. Geraghty, J. Zschocke, E. Christensen, G.F. Hoffmann, P. Chakraborty. Diagnosis of glutaric aciduria type 1 by measuring 3-hydroxyglutaric acid in dried urine spots by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2011, 34, 173–180.

[53] Y. Kinoshita, S. Yamada, K. Haraguchi, T. Takayanagi, Y. Mori, T. Takahashi, E. Haruki. Determination of vanillylmandelic acid, vanillactic acid, and homovanillic acid in dried urine on filter-paper discs by high-performance liquid chromatography with coulometric electrochemical detection for neuroblastoma screening. *Clin. Chem.*, 1988, 34, 2228–2230.

[54] C. Barbas, A. García, L. de Miguel, C. Simó. Evaluation of filter paper collection of urine samples for detection and measurement of organic acidurias by capillary electrophoresis. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2002, 780, 73–82.

[55] H. Blasco, M.-A. Garrigue, A. Vos, C. Antar, F. Labarthe, F. Maillot, C.R. Andres, L. Nadal-Desbarats. Filter paper saturated by urine sample in metabolic disorders detection by proton magnetic resonance spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, 396, 1205–1211.

[56] S. Koyano, N. Inoue, A. Oka, H. Moriuchi, K. Asano, Y. Ito, H. Yamada, T. Yoshikawa, T. Suzutani. Screening for congenital cytomegalovirus infection using newborn urine samples collected on filter paper: feasibility and outcomes from a multicentre study. *BMJ Open*, 2011, 1, e000118.

[57] M.T. McCann, M.M. Thompson, I.C. Gueron, M. Tuchman. Quantification of orotic acid in dried filter-paper urine samples by stable isotope dilution. *Clin. Chem.*, 1995, 41, 739–743.

[58] X. Fu, M. Iga, M. Kimura, S. Yamaguchi. Simplified screening for organic acidemia using GC/MS and dried urine filter paper: a study on neonatal mass screening. *Early Hum. Dev.*, 2000, 58, 41–55.

[59] A.B.P. van Kuilenburg, H. van Lenthe, M. Löffler, A.H. van Gennip. Analysis of pyrimidine synthesis “de novo”

intermediates in urine and dried urine filter-paper strips with HPLC-electrospray tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.*, 2004, 50, 2117–2124.

[60] A.A. Alfazil, R.A. Anderson. Stability of benzodiazepines and cocaine in blood spots stored on filter paper. *J. Anal. Toxicol.*, 2008, 32, 511–515.

[61] R.G. Boy, J. Henseler, R. Mattern, G. Skopp. Determination of morphine and 6-acetylmorphine in blood with use of dried blood spots. *Ther. Drug Monit.*, 2008, 30, 733–739.

[62] A.H. Redondo, C. Körber, S. König, A. Längin, A. Al-Ahmad, W. Weinmann. Inhibition of bacterial degradation of EtG by collection as dried urine spots (DUS). *Anal. Bioanal. Chem.*, 2012, 402, 2417–2424.

[63] R. Fingerhut, B. Olgemoeller. Newborn screening for inborn errors of metabolism and endocrinopathies: an update. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, 393, 1481–1497.

[64] G. la Marca, S. Malvagia, L. Filippi, F. Luceri, G. Moneti, R. Guerrini. A new rapid micromethod for the assay of phenobarbital from dried blood spots by LC-tandem mass spectrometry. *Epilepsia*, 2009, 50, 2658–2662.

[65] R. ter Heine, H. Rosing, E.C.M. van Gorp, J.W. Mulder, J.H. Beijnen, A.D.R. Huitema. Quantification of etravirine (TMC125) in plasma, dried blood spots and peripheral blood mononuclear cell lysate by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 2009, 49, 393–400.

[66] R. Fingerhut, R. Ensenauer, W. Roechinger, R. Arnecke, B. Olgemoeller, A.A. Roscher. Stability of acylcarnitines and free carnitine in dried blood samples: implications for retrospective diagnosis of inborn errors of metabolism and neonatal screening for carnitine transporter deficiency. *Anal. Chem.*, 2009, 81, 3571–3575.

[67] E. Kralj, J. Trontelj, T. Pajič, A. Kristl. Simultaneous measurement of imatinib, nilotinib and dasatinib in dried blood spot by ultra high performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2012, 903, 150–156.

[68] A. Faller, B. Richter, M. Kluge, P. Koenig, H.K. Seitz, G. Skopp. Stability of phosphatidylethanol species in spiked and authentic whole blood and matching dried blood spots. *Int. J. Legal Med.*, 2013, 127, 603–610.

[69] B.W. Adam, E.M. Hall, M. Sternberg, T.H. Lim, S.R. Flores, S. O'Brien, D. Simms, L.X. Li, V.R. De Jesus, W.H. Hannon. The stability of markers in dried-blood spots for recommended newborn screening disorders in the United States. *Clin. Biochem.*, 2011, 44, 1445–1450.

[70] B.W. Adam, D.L. Chafin, V.R. De Jesus. Stabilities of hemoglobins A and S in dried blood spots stored under controlled conditions. *Clin. Biochem.*, 2013, 46, 1089–1092.

[71] J. Chen, Y. Hsieh. Stabilizing drug molecules in biological samples. *Ther. Drug Monit.*, 2005, 27, 617–624.

[72] D.F. El-Hajjar, K.H. Swanson, J.D. Landmark, D.F. Stickle. Validation of use of annular once-punched filter paper bloodspot samples for repeat lead testing. *Clin. Chim. Acta*, 2007, 377, 179–184.

[73] X. Ren, T. Paehler, M. Zimmer, Z. Guo, P. Zane, G.T. Emmons. Impact of various factors on radioactivity distribution in different DBS papers. *Bioanalysis*, 2010, 2, 1469–1475.

[74] U. Kumtabtim, A. Siripinyanond, C. Auray-Blais, A. Ntwari, J.S. Becker. Analysis of trace metals in single droplet of urine by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, 2011, 307, 174–181.

[75] Direct extraction/analysis of Dried Blood Spots (DBS): A fully automated system including spot localization, internal standard (IS) application and multiple batch analysis. http://www.camag.com/en/lp/camag_dbs-ms_500.cfm (last accessed 26-03-2014).

[76] P. Abu-Rabie. Direct analysis of DBS: emerging and desirable technologies. *Bioanalysis*, 2011, 3, 1675–1678.

[77] R.F. Coombes. Neonatal TSH RIA using dried blood spotted on filter-paper. *Clin. Chem.*, 1978, 24, 1038–1038.

[78] B. Wilcken. Newborn screening for cystic fibrosis: Techniques and strategies. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2007, 30, 537–543.

[79] P.W. Speiser. Editorial: Improving neonatal screening for congenital adrenal hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, 2004, 89, 3685–3686.

[80] D.H. Chace, S.L. Hillman, B. Shushan, J.J. Corr. Multiple metabolic profiles from dried filter paper blood spots using electrospray tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.*, 1997, 43 (Suppl. 6), 436–436.

[81] H.-R. Yoon. Two step derivatization for the analyses of organic, amino acids and glycines on filter paper

plasma by GC-MS/SIM. *Arch. Pharm. Res.*, 2007, 30, 387–395.

[82] J. Déglon, E. Lauer, A. Thomas, P. Mangin, C. Staub. Use of the dried blood spot sampling process coupled with fast gas chromatography and negative-ion chemical ionization tandem mass spectrometry: application to fluoxetine, norfluoxetine, reboxetine, and paroxetine analysis. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, 396, 2523–2532.

[83] M.F. Suyagh, G. Iheagwaram, P.L. Kole, J. Millership, P. Collier, H. Halliday, J.C. McElnay. Development and validation of a dried blood spot-HPLC assay for the determination of metronidazole in neonatal whole blood samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, 397, 687–693.

[84] R. Tawa, S. Hirose, T. Fujimoto. Determination of the aminoglycoside antibiotics sisomicin and netilmicin in dried blood spots on filter disks, by high-performance liquid-chromatography with pre-column derivatization and fluorimetric detection. *J. Chromatogr. Biomed. Appl.*, 1989, 490, 125–132.

[85] P. Patel, S. Tanna, H. Mulla, V. Kairamkonda, H. Pandya, G. Lawson. Dexamethasone quantification in dried blood spot samples using LC-MS: The potential for application to neonatal pharmacokinetic studies. *J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2010, 878, 3277–3282.

[86] P. Abu-Rabie, N. Spooner. Direct quantitative bioanalysis of drugs in dried blood spot samples using a thin-layer chromatography mass spectrometer interface. *Anal. Chem.*, 2009, 81, 10275–10284.

[87] R.B. Cody, J.A. Laramee, H.D. Durst. Versatile new ion source for the analysis of materials in open air under ambient conditions. *Anal. Chem.*, 2005, 77, 2297–2302.

[88] N.E. Manicke, Q. Yang, H. Wang, S. Oradu, Z. Ouyang, R.G. Cooks. Assessment of paper spray ionization for quantitation of pharmaceuticals in blood spots. *Int. J. Mass Spectrom.*, 2011, 300, 123–129.

[89] Q. Yang, H. Wang, J.D. Maas, W.J. Chappell, N.E. Manicke, R.G. Cooks, Z. Ouyang. Paper spray ionization devices for direct, biomedical analysis using mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, 2012, 312, 201–207.

[90] E.R.B. McCabe, S.Z. Huang, W.K. Seltzer, M.L. Law. DNA microextraction from dried blood spots on filter-paper blotters. Potential applications to newborn screening. *Hum. Genet.*, 1987, 75, 213–216.

[91] E.K. Langer, K.J. Johnson, M.M. Shafer, P. Gorski, J. Overdier, J. Musselman, J.A. Ross. Characterization of the elemental composition of newborn blood spots using sector-field inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J. Expos. Sci. Environ. Epidemiol.*, 2011, 21, 355–364.

[92] S. Forni, X. Fu, L. Sweetman, R. Schiffmann. Determination of urinary globotriaosylceramide by UPLC-MS/MS: Urine dried on filter paper versus liquid urine. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2008, 31, 124–124.

[93] C. Auray-Blais, P. Lavoie, H. Zhang, R. Gagnon, J.T.R. Clarke, B. Maranda, S.P. Young, Y. An, D.S. Millington. An improved method for glycosaminoglycan analysis by LC–MS/MS of urine samples collected on filter paper. *Clin. Chim. Acta*, 2012, 413, 771–778.

[94] T. Kuhara. Diagnosis of inborn errors of metabolism using filter paper urine, urease treatment, isotope dilution and gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 2001, 758, 3–25.

[95] H. Wang, J. Liu, R.G. Cooks, Z. Ouyang. Paper spray for direct analysis of complex mixtures using mass spectrometry. *Angew. Chem. Int. Ed.*, 2010, 49, 877–880.

[96] H.T. Delves. A micro-sampling method for rapid determination of lead in blood by atomic-absorption spectrophotometry. *Analyst*, 1970, 95, 431–438.

[97] H.W. Chen, Z.Z. Pan, N. Talaty, D. Raftery, R.G. Cooks. Combining desorption electrospray ionization mass spectrometry and nuclear magnetic resonance for differential metabolomics without sample preparation. *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 2006, 20, 1577–1584.

[98] E. Crawford, J. Gordon, J.-T. Wu, B. Musselman, R. Liu, S. Yu. Direct analysis in real time coupled with dried spot sampling for bioanalysis in a drug-discovery setting. *Bioanalysis*, 2011, 3, 1217–1226.

[99] J.V. Cizdziel. Determination of lead in blood by laser ablation ICP-TOF-MS analysis of blood spotted and dried on filter paper: a feasibility study. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, 388, 603–611.

[100] S. O'Broin. Influence of hematocrit on quantitative analysis of “blood spots” on filter paper. *Clin. Chem.*, 1993, 39, 1354–1355.

[101] J.M. Lacey, C.Z. Minutti, M.J. Magera, A.L. Tauscher, B. Casetta, M. McCann, J. Lymp, S.H. Hahn, P. Rinaldo, D. Matern. Improved specificity of newborn screening for congenital adrenal hyperplasia by second-tier steroid profiling using tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.*, 2004, 50, 621–625.

[102] N. Janzen, S. Sander, M. Terhardt, M. Peter, J. Sander. Fast and direct quantification of adrenal steroids by tandem mass spectrometry in serum and dried blood spots*J. Chromatogr. B Anal. Technol. Biomed. Life Sci.*, 2008, 861, 117–122.

[103] P. Abu-Rabie, P. Denniff, N. Spooner, J. Brynjolffssen, P. Galluzzo, G. Sanders. Method of applying internal standard to dried matrix spot samples for use in quantitative bioanalysis. *Anal. Chem.*, 2011, 83, 8779–8786.

[104] C.G. Fraga. Relevance, essentiality and toxicity of trace elements in human health. *Mol. Aspects Med.*, 2005, 26, 235–244.

[105] A. Shenkin, M. Baines, G.S. Fell, T.D.B. Lyon. Chapter 30: Vitamins and Trace Elements, in: C.A. Burtis, E.R. Ashwood, D.E. Bruns (Eds.), Tietz Textbook of Clinical Chemistry and Molecular Diagnostics, Fourth Edition. Elsevier Saunders, St. Louis, Missouri, USA, 2006.

[106] A.A. Cernik, M.H. Sayers. Determination of lead in capillary blood using a paper punched disc atomic absorption technique. Application to the supervision of lead workers. *Br. J. Ind. Med.*, 1971, 28, 392–398.

[107] K. Verebey, Y.M. Eng, B. Davidow, A. Ramon. Rapid, sensitive micro blood lead analysis: a mass screening technique for lead poisoning. *J. Anal. Toxicol.*, 1991, 15, 237–240.

[108] S.T. Wang, H.P. Demshar. Determination of blood lead in dried blood-spot specimens by Zeeman-efect background corrected atomic-absorption spectrometry. *Analyst*, 1992, 117, 959–961.

[109] D.J. Schonfeld, M.R. Cullen, P.M. Rainey, A.T. Berg, D.R. Brown, J.C. Hogan, D.S. Turk, C.S. Rude, D.V. Cicchetti. Screening for lead-poisoning in an urban pediatric-clinic using samples obtained by fingerstick. *Pediatrics*, 1994, 94, 174–179.

[110] K. Verebey, J.F. Rosen, D.J. Schonfeld, D. Carriero, Y.M. Eng, J. Deutsch, S. Reimer, J. Hogan. Blood collection and analytical considerations in blood lead screening in children. *Clin. Chem.*, 1995, 41, 469–470.

[111] Y.W. Wong, E.R. Ashwood, W. Gordon, K.O. Ash. ICP-MS quantitation of lead in blood collected in paper. *Clin. Chem.*, 1995, 41, S145.

[112] H.Y. Yee, K. Srivuthana, R. Elton, K. Bhambhani, R.E. Kauffman. Capillary blood collection by paper for lead analysis by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Microchem. J.*, 1995, 52, 370–375.

[113] H.Y. Yee, T.G. Holtrop. An improved capillary blood-filter paper-graphite furnace atomic absorption spectrometric method for lead screening. *J. Anal. Toxicol.*, 1997, 21, 142–148.

[114] M.T. Di Martino, A. Michniewicz, M. Martucci, G. Parlato. EDTA is essential to recover lead from dried blood spots on filter paper. *Clin. Chim. Acta*, 2004, 350, 143–150.

[115] S.N. Chaudhuri, S.J.M. Butala, R.W. Ball, C.T. Braniff. Pilot study for utilization of dried blood spots for screening of lead, mercury and cadmium in newborns. *J. Expos. Sci. Environ. Epidemiol.*, 2009, 19 298–316.

[116] H.T. Delves. Blood collection for screening children for exposure to lead. *Clin. Chem.*, 1996, 42, 983–984.

[117] K. Verebey. Blood collection for screening children for exposure to lead - Respond. *Clin. Chem.*, 1996, 42, 984–985.

[118] H.T. Delves. Blood lead screening (continued). *Clin. Chem.*, 1997, 43, 1246–1247.

[119] K. Verebey. Blood lead screening (continued) - Response. *Clin. Chem.*, 1997, 43, 1247–1248.

[120] N.V. Stanton, J.M. Maney, R. Jones. Evaluation of filter paper blood lead methods: results of a pilot proficiency testing program. *Clin. Chem.*, 1999, 45, 2229–2235.

[121] K. Verebey. Filter paper-collected blood lead testing in children. *Clin. Chem.*, 2000, 46, 1024–1026.

[122] T.P. Moyer, D. Nixon, O.K. Ash. Filter paper-collected blood lead testing in children - Response. *Clin. Chem.*, 2000, 46, 1026–1028.

[123] N. Stanton, J. Maney, R. Jones. More on filter paper lead testing. *Clin. Chem.*, 2000, 46, 1028–1029.

[124] C. Bendicho, M.T.C. de Loos-Vollebregt. Solid sampling in electrothermal atomic absorption spectrometry using commercial atomizers. A review. *J. Anal. At. Spectrom.*, 1991, 6, 353–374.

[125] M.G.R. Vale, N. Oleszczuk, W.N.L. dos Santos. Current status of direct solid sampling for electrothermal atomic absorption spectrometry - A critical review of the development between 1995 and 2005. *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2006, 41, 377–400.

[126] M. Resano, F. Vanhaecke, M.T.C. de Loos-Vollebregt. Electrothermal vaporization for sample introduction in atomic absorption, atomic emission and plasma mass spectrometry—a critical review with focus on solid

sampling and slurry analysis. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2008, 23, 1450–1475.

[127] M. Aramendía, M. Resano, F. Vanhaecke. Electrothermal vaporization-inductively coupled plasma-mass spectrometry: A versatile tool for tackling challenging samples - A critical review. *Anal. Chim. Acta*, 2009, 648, 23–44.

[128] J. Pisonero, B. Fernandez, D. Guenther. Critical revision of GD-MS, LA-ICP-MS and SIMS as inorganic mass spectrometric techniques for direct solid analysis. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2009, 24, 1145–1160.

[129] M. Valcárcel, A. Ríos. The hierarchy and relationships of analytical properties. *Anal. Chem.*, 1993, 65, 781A–787A.

[130] M.A. Belarra, M. Resano, F. Vanhaecke, L. Moens. Direct solid sampling with electrothermal vaporization/atomization: what for and how? *Trends Anal. Chem.*, 2002, 21, 828–839.

[131] M. Resano, J. Briceño, M.A. Belarra. Direct determination of Hg in polymers by solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry. A comparison of the performance of line source and continuum source instrumentation. *Spectrochim. Acta Part B*, 2009, 64, 520–529.

[132] M. Resano, E. García-Ruiz, F. Vanhaecke. Laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry in archaeometric research. *Mass Spectrom. Rev.*, 2010, 29, 55–78.

[133] M. Resano, E. García-Ruiz, M.A. Belarra, F. Vanhaecke, K.S. McIntosh. Solid sampling in the determination of precious metals at ultratrace levels. *Trends Anal. Chem.*, 2007, 26, 385–395.

[134] S.F. Durrant, N.I. Ward. Recent biological and environmental applications of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS). *J. Anal. At. Spectrom.*, 2005, 20, 821–829.

[135] J. Briceño, M.A. Belarra, K.A.C. De Schamphelaere, S. Vanblaere, C.R. Janssen, F. Vanhaecke, M. Resano. Direct determination of Zn in individual Daphnia magna specimens by means of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2010, 25, 503–510.

[136] Z. Qin, J.A. Caruso, B. Lai, A. Matusch, J.S. Becker. Trace metal imaging with high spatial resolution: Applications in biomedicine. *Metallomics*, 2011, 3, 28–37.

[137] L. Yang, R.E. Sturgeon, Z. Mester. Quantitation of trace metals in liquid samples by dried-droplet laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 2005, 77, 2971–2977.

[138] H.-F. Hsieh, W.-S. Chang, Y.-K. Hsieh, C.-F. Wang. Lead determination in whole blood by laser ablation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta*, 2009, 79, 183–188.

[139] T. Narukawa, S. Willie. Dried deposits of biological tissues solubilized using formic acid for LA ICP-TOF-MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2010, 25, 1145–1148.

II. Experimental

II.1. Instrumentos, aparatos y material.

II.1.1. Instrumentos de absorción atómica.

Espectrofotómetros de absorción atómica, Perkin-Elmer modelo 4110ZL y Analytik Jena modelo ZEEnit 600.

Se trata de dos instrumentos convencionales para las medidas de absorción atómica con atomización en horno de grafito y cuyas partes esenciales son: fuente de radiación de cátodo hueco, sistema atomizador en tubo de grafito con calentamiento transversal y un sistema corrector de absorción inespecífica basado en el efecto Zeeman. La introducción de las muestras líquidas se realizó mediante los muestreadores automáticos AS-72 (para el Perkin-Elmer) y MPE-60 (para el Analytik Jena).

Estos instrumentos se utilizaron para las medidas de plomo sanguíneo en las muestras venosas líquidas (sangre diluida) que se exponen en los Apartados III.1 y III.2 y para la determinación de cobre en las muestras de orina líquidas del Apartado III.6. Como fuente de radiación se utilizaron sendas lámpara de cátodo hueco de Perkin-Elmer o Analytik Jena (para el plomo), según el instrumento utilizado, y de Analytik Jena (para el cobre).

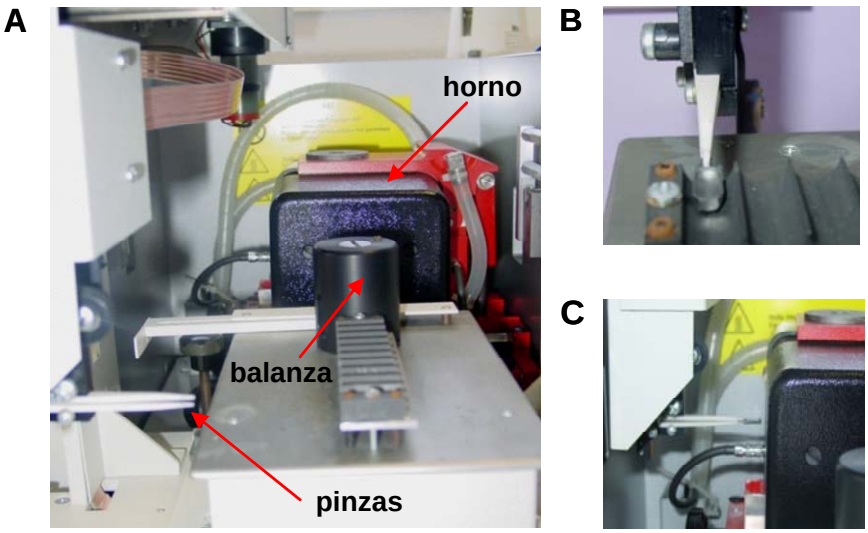
Espectrofotómetro de absorción atómica, Analytik Jena modelo AAS 5 EA.

En sus componentes básicos este instrumento, que se muestra en la Figura II.1, es semejante a los anteriores, salvo que el sistema corrector de absorción inespecífica es mediante lámpara de deuterio.

El aspecto más importante de este instrumento es que dispone del dispositivo Analytik Jena SSA 51 para la introducción automática de las muestras sólidas en el horno de grafito por medio de plataformas del mismo material [1] y que además lleva incorporado una microbalanza Sartorius M2P con precisión de 1 µg. Los detalles más relevantes de este dispositivo se presentan en la Figura II.2. Para realizar las medidas se utilizaron tubos de grafito pirolítico especiales para sólidos, de apertura lateral más grande y sin el orificio de dosificación de la parte superior.

Figura II.1. Espectrofotómetro de absorción atómica de Analytik Jena modelo AAS 5 EA.

Figura II.2. Detalle del dispositivo Analytik Jena SSA 51 para la introducción de muestras sólidas.



A) Esquema de disposición del horno, balanza y sistema de introducción de muestras. B) Detalle de la pinza tomando la plataforma del portamuestras. C) Detalle de la pinza depositando la plataforma en el horno.

Este instrumento se utilizó para las medidas de plomo en los *DBS* que se exponen en el Apartado III.1. Como fuente de radiación se utilizó una lámpara de cátodo hueco de plomo, también de Analytik Jena.

Espectrofotómetro de absorción atómica, Analytik Jena modelo ContrAA 700.

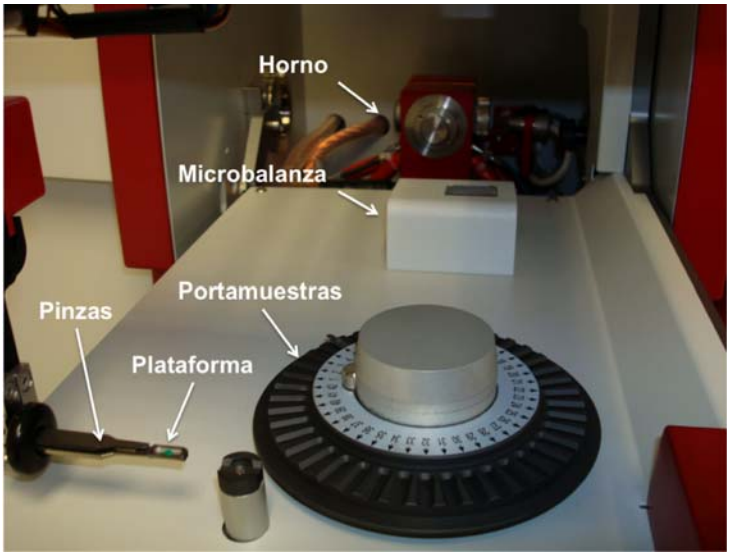
Este instrumento, que se muestra en la Figura II.3, difiere significativamente de los anteriores pues sustituye la fuente de línea (lámpara de cátodo hueco) por una fuente continua (lámpara de xenón) y está dotado de un doble monocromador y un detector *CDC* (*charge-coupled device*, dispositivo de carga acoplada) que le permite obtener una elevadísima resolución espectral [2]. La atomización puede realizarse en llama o en horno de grafito con calentamiento transversal aunque en los distintos trabajos de esta Memoria sólo se utilizó esta última.

Figura II.3. Espectrofotómetro de absorción atómica de Analytik Jena modelo ContrAA 700.

Las características esenciales de este instrumento se comentarán en el Apartado III.3 pues, debido a su novedad (se comercializó con posterioridad al inicio de esta Tesis Doctoral), se dedicó dicho apartado a evaluar alguna de sus prestaciones y las ventajas que podía suponer su utilización en el contexto de estos trabajos.

Como el modelo AAS 5 EA de Analytik Jena, este instrumento también cuenta con un sistema de introducción automática para muestras sólidas, el SSA 600 que se presenta en la Figura II.4. La comparación de ésta con la Figura II.2 indica que este muestreador es conceptualmente semejante al SSA 51 (pinzas, portamuestras y microbalanza Sartorius M2P) pero tiene una mayor capacidad de muestreo automático pues puede gestionar hasta 84 muestras (dos portamuestras en cada uno de los cuales se pueden colocar 42 plataformas).

Figura II.4. Detalle del dispositivo Analytik Jena SSA 600 para la introducción de muestras sólidas.



El instrumento ContrAA 700 se utilizó para las medidas de plomo en los *DBS* (sólo las del Apartado III.2), del molibdeno y titanio en los *DUS* (Apartado III.4) y en las experiencias de estudio del nuevo instrumento que se exponen en el Apartado III.3. En alguna de las experiencias descritas en este apartado se sustituyó este muestreador de sólidos por el de líquidos MPE-60.

II.1.2. Instrumentos de *LA-ICP-MS*.

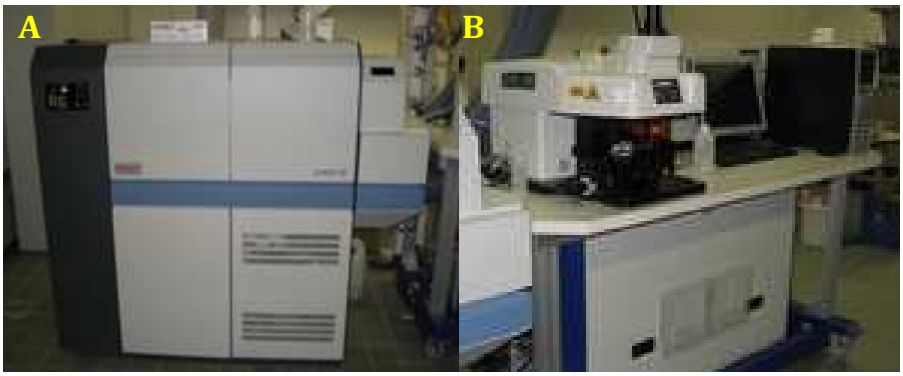
Sistema de ablación por láser New Wave Research modelo UP193HE acoplado a un instrumento ICP-MS Thermo Scientific, modelo Thermo Element XR.

El sistema de ablación de New Wave Research consiste en un láser excímero de ArF* de una longitud de onda de 193 nm que permite utilizar frecuencias de hasta 20 Hz y un tamaño de haz de entre 5 y 400 µm. En todos los trabajos se utilizó la celda de ablación estándar (30 cm^3), con una capacidad para alojar simultáneamente hasta 4 discos de los *DUS* utilizados, cada uno de 16 mm de diámetro.

Las medidas se realizaron con un instrumento de *ICP-MS* de sector magnético, con geometría Nier–Johnson reversa, modelo Thermo Element XR (Thermo Scientific, Bremen, Alemania). Dicho dispositivo puede operar en tres modos de resolución: baja (m/Δm≈300), media (m/Δm≈4000) y alta (m/Δm≈10000). Asimismo, el instrumento permite utilizar tres modos de detección: conteo (*counting*), analógico y copas de Faraday, para extender el rango lineal hasta 12-13 órdenes de magnitud.

Esta instrumentación, que se presenta en la Figura II.5, se utilizó en la obtención de los resultados del Apartado III.5.

Figura II.5. Sistema de ablación por láser modelo UP193HE de New Wave Research con el instrumento *ICP-MS* Thermo Element XR.



A) Instrumento de ICP-MS Thermo Element XR. B) Sistema de ablación láser UP193HE.

Sistema de ablación por láser Lambda 3 femtosecond acoplado a un instrumento de ICP-MS con multicolector fabricado por Nu Instruments, modelo Nu Plasma.

Se utilizó un instrumento Nu Plasma *ICP-MS* (Nu instruments, Wrexham, UK) de sector magnético y con detectores multicolectores, acoplado a un sistema de ablación láser Lambda 3 femtosecond (Nexeya SA, Canejan, Francia). Este láser está equipado con una fuente de láser *diode-pumped Yb:KGW crystal* (HP2, Amplitudes Systèmes, Pessac, Francia) emitiendo pulsos de 360 fs. Se pueden seleccionar tres longitudes de onda: 1030 nm (fundamental), 515 nm (segundo armónico) y 257 nm (cuarto armónico). En este estudio se utilizó la longitud de 257 nm. La fuente de láser opera dentro de un amplio rango de frecuencias de repetición (1-100 kHz) y baja energía (a esta longitud de onda, desde 200 µJ $pulso^{-1}$ por debajo de 1 kHz hasta 1.5 µJ $pulso^{-1}$ a 100 kHz). El haz del láser puede moverse muy rápidamente (hasta 2 m/s) para cubrir una superficie de 16 x 16 mm^2.

Un modelo similar aunque más antiguo de este sistema de ablación láser (que opera únicamente en la región IR) está descrito en varios trabajos [3,4] en los que se pueden consultar detalles adicionales.

El acoplamiento *LA-ICP-MS* se llevó a cabo utilizando un tubo antiestático de 10 m de largo (*PTFE* electroconductor, Fisher Bioblock, Illkirch Cedex, Francia) de 6 mm de diámetro externo y 4 mm de diámetro interno (Legris SA). Se utilizó una antorcha de dos entradas para mezclar el aerosol generado por el láser junto con un aerosol líquido (nebulizado por medio de un nebulizador neumático micro-concéntrico de 200 µL min^{-1} de flujo combinado con una cámara *mini-cyclonic Cinnabar spray*) antes de la introducción en el plasma [5,6].

Esta instrumentación, que se presenta en la Figura II.6, se utilizó en la obtención de los resultados del Apartado III.6.

Figura II.6. Sistema de ablación por láser Lambda 3 femtosecond acoplado al instrumento *ICP-MS* Nu Plasma.

II.1.3. Aparatos y material.

Balanzas analíticas.

Las pesadas realizadas durante los experimentos relacionados con la determinación de la relación isotópica de cobre en orina depositada en papel de filtro (Apartado III.6) se realizaron en una balanza Sartorius modelo BP211D, con una precisión de 10^{-5} g.

En los trabajos de *GF-AAS*, todas las pesadas que no se realizaron con las microbalanzas de los espectrofotómetros, se hicieron con una balanza Sartorius modelo BP 110S con una precisión de décima de miligramo.

Troquelador automático Perkin Elmer modelo Wallac DBS Puncher 1296-071.

Este aparato permite obtener discos del papel de filtro utilizado de 3.2, 4.7 o 6.0 mm de diámetro sin más que cambiar el cabezal troquelador. El dispositivo está diseñado para la dispensación automática de los discos en microplacas de 96 pocillos, de forma que cada vez que se produce un troquel, el disco cae sobre un pocillo de la microplaca y ésta es desplazada hacia la posición siguiente. El aparato se presenta en la Figura II.7.

Figura II.7. Troquelador automático Wallac DBS Puncher 1296-071 de Perkin Elmer.

Todos los discos preparados para realizar las medidas por *GF-AAS* de los Apartados III.1 a III.4 (*DBS*, *DUS* y blancos), fueron de 3.2 mm, ya que es el tamaño máximo que cabe en la plataforma y, por lo tanto, que se puede introducir en el horno de grafito.

Troquelador manual

Se utilizó un troquelador manual (Artemio, Wavre, Bélgica) para la obtención de los discos circulares de mayor diámetro (16 mm) que se utilizaron en las medidas mediante *LA-ICP-MS*.

Papel de filtro Whatman 903.

Las tarjetas de papel Whatman 903 se obtuvieron de Whatman International Ltd. (Maidstone, Kent, Reino Unido). Este papel está registrado por la *Food and Drug Administration* como un dispositivo médico para el análisis *in vitro* de clase II, por lo que debe cumplir unos requisitos muy estrictos en cuanto a su proceso de fabricación y variabilidad entre lotes.

En la mayor parte de esta Memoria se utilizaron tarjetas previamente impresas por un distribuidor local para ser utilizadas en la recogida de los *DBS* para el cribado neonatal autonómico de Aragón (ver la Figura II.8), pero en el Apartado III.6 se usaron pliegos totalmente blancos sin ningún tipo de tinta.

Figura II.8. Tarjeta de papel de filtro Whatman 903 para el cribado neonatal de Aragón.

Otro material.

En el desarrollo de estos trabajos se utilizaron materiales clínicos y de laboratorio (lancetas, agujas, tubos *eppendorf*, tubos de polipropileno, micropipetas, matraces aforados, etc.) de uso común.

Los materiales que se utilizaron en las determinaciones mediante *GF-AAS* estuvieron en contacto, durante al menos dos meses, con disoluciones de HNO_3 0.14 M. El análisis de estas disoluciones no produjo señales significativamente diferentes de los blancos para ninguno de los elementos estudiados.

II.2. Patrones y reactivos.

II.2.1. Materiales de referencia.

ERM-CE194 Bovine Blood.

Se obtuvo de IRMM (*Institute for Reference Materials and Measurements*; Geel, Bélgica) y se presentaba como un material liofilizado que, una vez reconstituido con 5 mL de agua desionizada, contenía 126 ± 4 µg de Pb L^{-1}. Se utilizó en los Apartados III.1 y III.2 de esta Memoria.

Clincheck Urine Control Level II y Seronorm Trace Element Urine.

El *Clincheck Urine Control Level II* se obtuvo de Recipe Chemicals Instruments GmbH (Múnich, Alemania; ref. 8848, lote 923) y viene presentado como un material liofilizado que, una vez reconstituido por 10 mL de agua desionizada, ofrece una concentración certificada de varios elementos. Los estudiados en esta Memoria se recogen en la Tabla II.1, con la concentración en µg L^{-1} y la incertidumbre expresada como intervalo de confianza al 95%.

Tabla II.1. Contenido en algunos elementos del *Clincheck Urine Control Level II*.

Mo	Cd	Co	Cu	Ni	Sb	Sn	Tl	Pb	V
109 ± 22	15.0 ± 3.0	34.5 ± 5.9	118 ± 23.6	44 ± 11	45.9 ± 9.8	9.43 ± 1.9	18.8 ± 3.8	64.5 ± 16.1	48.4 ± 9.7

Este material se utilizó para los estudios de los Apartados III.4 a III.6. Para los del Apartado III.4 se fortificó con titanio hasta una concentración final de 100 µg de Ti L^{-1} y para los del Apartado III.5 con berilio y bismuto hasta una concentración final de 10 µg L^{-1} en ambos elementos. Estas fortificaciones se realizaron empleando pequeños volúmenes de la correspondiente disolución patrón de los elementos, introduciendo un factor de dilución en los materiales de control inferior al 3%, para tratar de mantener la matriz lo más inalterada posible.

Por su parte, el *Seronorm Trace Element Urine* se obtuvo de Alere (Stockport, UK; ref. 201205, lote 0511545), también viene presentado de forma liofilizada y, cuando se reconstituye con 5 mL de agua desionizada, contiene 49.3 ± 1.3 µg de Mo L^{-1} y 21.0 ± 3.1 µg de Ti L^{-1}, con incertidumbres expresadas como desviaciones estándar.

Este material se utilizó en el Apartado III.4 para lo que fue reforzado con titanio (su contenido está cerca del límite de cuantificación) hasta una concentración final de 121 µg de Ti L^{-1} con las mismas precauciones que el *Clincheck Urine Control Level II*.

II.2.2. Disoluciones patrón.

Para los trabajos realizados mediante *GF-AAS*, las disoluciones acuosas utilizadas de los distintos analitos (plomo, níquel, plata, molibdeno y titanio) y de los modificantes químicos o patrones internos utilizados (platino, paladio, rodio, níquel y cobalto), se prepararon a partir de patrones comerciales (Merck, Darmstadt, Alemania) de 10 g L^{-1} (para el paladio) o de 1 g L^{-1} (para el resto), mediante la apropiada dilución con HNO_3 0.14 M.

Para los estudios mediante *LA-ICP-MS* del Apartado III.5 se utilizaron patrones comerciales monoelementales para *ICP-MS* de 1 g L^{-1} (Inorganic Ventures, USA) de berilio, bismuto, cadmio, cobalto, cobre, níquel, plomo, antimonio, estaño, talio, vanadio (analitos) y rodio y platino (patrones internos). Para la preparación de disoluciones patrón multielementales se realizaron las mezclas necesarias y, en todos los casos, se procedió a las oportunas diluciones con HNO_3 0.14 M.

Los patrones enriquecidos isotópicamente de cadmio y cobre se adquirieron de Campro Scientific (Países Bajos) (^{111}Cd-enriquecido, con un 96.44% de ^{111}Cd; ^{65}Cu-enriquecido, con un 94.75% de ^{65}Cu) y se presentan en forma sólida como óxidos de dichos elementos. Para el plomo, se utilizó el *Standard Reference Material 983* (*National Institute of Standards and Technology*, USA). Está disponible como un alambre metálico y tiene un contenido atómico certificado de ^{206}Pb de 92.1497 $\pm$ 0.0041 %. Estos patrones se disolvieron en ácido nítrico concentrado.

Las disoluciones de cobre (analito) y níquel (patrón interno) utilizadas en el Apartado III.6 se prepararon a partir de patrones comerciales de 1 g L^{-1} (SCP Sciences, Canadá) mediante la apropiada dilución con HNO_3 0.14 M.

Asimismo, se preparó una disolución de trabajo de cobalto de 10706 mg L^{-1}, para investigar su utilidad como estándar interno en la medida de molibdeno y titanio en los *DUS*, y se obtuvo disolviendo 5287 mg de $Co(NO_3)_26H_20$ (Panreac, Barcelona, España) en 100 mL de HNO_3 0.14 M.

II.2.3. Otros reactivos.

Agua desionizada convencional que se obtuvo con un sistema Milli-Q (Millipore, Billerica, USA).

Agua ultrapura, con una resistividad ≥18.2 mΩ.cm, que se obtuvo con un equipo Direct-Q3 (Millipore, Mollsheim, Francia). Se utilizó en los trabajos mediante *LA-ICP-MS*.

Suero fisiológico (Baxter, Deerfield, USA, referencia 619023). Dado que se utilizó para diluir los patrones acuosos de plomo, se comprobó que estaba exento de este elemento.

Ácido nítrico comercial (aproximadamente 14 M) de Merck (Darmstadt, Alemania).

Ácido nítrico para análisis de Merck (Darmstadt, Alemania) que se purificó mediante un sistema de destilación. Se utilizó en los trabajos de *LA-ICP-MS*.

Disolución de NaCl, que se preparó disolviendo la cantidad adecuada del reactivo sólido (Merck, Darmstadt, Alemania) en HNO_3 0.14 M para obtener una concentración final de sodio de 2500 mg L^{-1}.

II.3. Obtención y preparación de las muestras.

En este apartado se describe la obtención y preparación de las muestras analizadas. Los materiales de referencia certificados (*ERM-CE194 Bovine Blood, Clincheck Urine Control Level II y Seronorm Trace Element Urine*) que se utilizaron para validar los distintos procedimientos se prepararon igual que las correspondientes muestras de sangre (*DBS*) y orina (*DUS* de difusión controlada).

II.3.1. Población utilizada para los análisis de sangre.

Durante unos dieciséis meses, se tomaron más de 500 muestras de neonatos, mujeres embarazadas y pacientes adultos. Las muestras de los recién nacidos se recogieron siempre que se requirió una muestra venosa líquida del niño para confirmar alguno de los resultados del cribado neonatal de enfermedades endocrino-metabólicas; los padres, tras ser informados del objetivo del trabajo, accedieron a que, una vez tomada la muestra sanguínea venosa, se les volviera a pinchar en el talón con una lanceta para la recogida simultánea de sangre capilar sobre un papel de filtro. Las muestras de las mujeres embarazadas que accedieron a participar en el estudio se tomaron entre las semanas 6 y 10 de gestación, cuando acudieron al hospital para el control del grupo y Rh sanguíneo, de acuerdo al protocolo local de seguimiento del embarazo. Los pacientes adultos fueron, en principio, sujetos sanos que acudieron al laboratorio del Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza, España) para una extracción de sangre porque debían realizarse un análisis solicitado por su médico y que accedieron a que se les tomara sangre del dedo para la preparación de los *DBS*.

Puesto que, afortunadamente, los niveles de plomo en sangre en nuestro entorno suelen ser bajos, la mayoría de las muestras tomadas de esta manera presentaban concentraciones de plomo en sangre (*BLL*; *blood lead level*) por debajo de 30 µg L^{-1} (la mayor concentración observada fue de 84 µg L^{-1}). Para poder validar completamente el método de *screening* que se estaba desarrollando (en el momento de realizar el trabajo el valor umbral que se consideraba de riesgo para provocar neurotoxicidad en niños era de 100 µg L^{-1}) se contactó con algunos pacientes adultos que, según los datos de la Unidad de Metales del Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Miguel Servet, tenían análisis previos indicativos de exposición al plomo. Aquellos que accedieron a participar se incluyeron en el estudio y así se dispuso de muestras con elevado *BLL*, de hasta 550 µg L^{-1}.

II.3.2. Recogida de sangre venosa.

Las muestras de sangre venosa líquida se obtuvieron mediante una flebotomía convencional.

II.3.3. Recogida de sangre capilar: preparación de los *DBS*.

La toma de muestra de sangre capilar del talón o del dedo de la mano la realizaron enfermeras siguiendo las instrucciones del documento LA4-A5, *Blood collection on filter paper for neonatal screening programs; Approved Standard* [7]. La sangre se dejó gotear sobre

tarjetas de papel de filtro Whatman 903 que posteriormente se dejaron secar a temperatura ambiente durante al menos cuatro horas.

Una vez seca la sangre, del fragmento del papel de filtro que la contiene (*DBS*) se troquelaron hasta siete discos de 3.2 mm de diámetro mediante el troquelador Wallac DBS Puncher 1296-071 (Figura II.9). Estos discos se almacenaron en tubos *eppendorf* hasta su análisis para minimizar la posibilidad de contaminación.

Figura II.9. *DBS* troquelados para la obtención de discos de 3.2 mm de diámetro.

II.3.4. Recogida de orina.

Las muestras de orina se obtuvieron en el Hospital Universitario Miguel Servet, procedentes de pacientes sanos que accedieron a donarlas para esta investigación. Una vez realizados los análisis clínicos solicitados por su médico, dichas muestras se anonimizaron y se conservaron refrigeradas (2-8 ºC) durante un periodo que pudo oscilar desde unos días hasta varias semanas. Dado que estas muestras contenían cantidades indetectables o muy pequeñas de los analitos de interés se fortificaron con pequeños volúmenes de disoluciones patrón de los mismos de forma similar a la explicada en los materiales de referencia.

Adicionalmente, para los estudios del Apartado III.6, se obtuvieron muestras de orina de seis pacientes afectados por la enfermedad de Wilson, que acudieron al Hospital Universitario Miguel Servet para la realización de análisis de cobre en orina solicitados por su médico y que, informados de esta investigación, accedieron a donar la muestra de orina una vez realizados los análisis en el Hospital. En el momento de la recogida de la muestra tres de estos pacientes estaban siguiendo un tratamiento con un agente quelante (penicilamina), mientras que los otros tres acababan de ser diagnosticados de la enfermedad de Wilson por lo que todavía no estaban siguiendo ningún tratamiento. También se dispuso de una muestra de un paciente no afectado por dicha enfermedad pero que presentaba unos niveles algo elevados de cobre en orina. Estas muestras de orina no se fortificaron.

II.3.5. Preparación de DUS de difusión libre.

Se pipetearon volúmenes medidos de orina (en diversas experiencias se utilizaron volúmenes entre 20 µL y 200 µL) sobre las tarjetas de papel de filtro Whatman 903, que son de tamaño relativamente grande (115 x 55 mm), de forma que aquélla pueda difundir libremente. Tras la deposición se sigue el mismo procedimiento expuesto anteriormente para los *DBS*: se dejan secar al aire durante al menos cuatro horas y posteriormente se troquelan discos de 3.2 mm que se almacenan en tubos *eppendorf* a temperatura ambiente hasta su análisis.

Dado que este procedimiento no proporcionó los resultados deseados, se intentó mejorarlo realizando varios ciclos sucesivos de deposición de orina/secado del papel. Ni siquiera con diez de estos ciclos se obtuvieron resultados satisfactorios.

II.3.6. Preparación de *DUS* de difusión controlada (*PS-DUS*).

Se cortó una pequeña porción de papel de filtro Whatman 903 (rectángulos de 17x19 mm para las medidas de Apartado III.4 y discos de 16 mm de diámetro para las de los Apartados III.5 y III.6) y se colocó sobre una superficie hidrófoba como policarbonato o PVC. Se depositó sobre el papel un volumen medido de orina (500 µL en las piezas rectangulares y 300 µL en las circulares, que son los máximos que pueden retenerse sobre los trozos de papel de filtro de ese tamaño por la tensión superficial), y se dejaron secar al aire durante al menos cuatro horas.

De los *PS-DUS* (*precut-saturated DUS*) rectangulares se troquelaron discos de 3.2 mm que se almacenaron en tubos *eppendorf* a temperatura ambiente hasta su análisis por *GF-AAS*, mientras que los *PS-DUS* circulares se conservaron íntegros en bolsas de plástico selladas a temperatura ambiente hasta la realización de los análisis por *LA-ICP-MS*.

II.4. Preparación de los patrones para el calibrado.

Para las determinaciones sobre muestras líquidas (plomo en sangre en los Apartados III.1 y III.2 y cobre en orina en el Apartado III.6 mediante *GF-AAS*; determinación multielemental en orina en el Apartado III.5) se utilizaron disoluciones patrón de los citados elementos para la obtención de las correspondientes curvas de calibrado.

Para las determinaciones realizadas sobre las muestras retenidas en papel de filtro, excepto las correspondientes a la determinación de la relación isotópica del cobre del Apartado III.6, se utilizó el método de patrones emparejados consistente en añadir a la matriz objeto de análisis, idealmente carente de los analitos estudiados, una disolución patrón de estos últimos. La preparación de estos patrones de describe a continuación.

Para los ensayos en blanco se utilizó el mismo papel de filtro que el usado para deponer las muestras, troquelado de igual forma.

II.4.1. Patrones para la determinación de plomo en sangre retenida en un *DBS*.

Se partió de una sangre venosa cuyo contenido en plomo, determinado por *GF-AAS* mediante el método convencional que se describe en II.5.1., se encuentra por debajo del límite de detección y, a fracciones de la misma, se le adicionaron pequeños volúmenes variables (en todos los casos menos del 2% del volumen de sangre, con objeto de minimizar la modificación de la matriz) de disolución patrón de plomo (obtenida por dilución de un patrón acuoso de 1 g de Pb L^{-1} con suero fisiológico, de forma que se evite la hemólisis de la sangre) para obtener las concentraciones finales deseadas (entre 10-837 µg L^{-1}). Dichas concentraciones se comprobaron de nuevo por el método convencional.

Estas sangres fortificadas se mantuvieron en los tubos de recolección, durante al menos 24 horas, en un agitador orbital automático para favorecer la integración del plomo adicionado a la matriz sanguínea. Finalmente se pipetearon 75 µL de cada una de las sangres fortificadas sobre tarjetas de papel de filtro Whatman 903 y se prosiguió la preparación de los correspondientes *DBS* de la forma expuesta para las muestras de sangre capilar.

II.4.2. Patrones para la determinación de titanio y molibdeno en orina retenida en un *PS-DUS*.

Se partió de una orina cuyo contenido en titanio y molibdeno, determinados por *GF-AAS* sobre la muestra líquida, se encontraba por debajo del límite de detección y, a fracciones de la misma, se le adicionaron pequeños volúmenes variables (en todos los casos menos del 10% del volumen de orina, con objeto de minimizar la modificación de la matriz) de una disolución patrón de titanio y molibdeno (obtenida por mezcla y dilución de los patrones acuosos de 1 g L^{-1} de estos elementos) para obtener las concentraciones finales deseadas (entre 20-500 µg L^{-1}, tanto para el titanio como para el molibdeno).

En algunos experimentos la disolución patrón de titanio y molibdeno con la que se fortificaban las orinas contenía también elevadas cantidades de cobalto (concentraciones finales entre 30-1000 mg de Co L^{-1}), con el objetivo de evaluar el uso de este elemento como patrón interno.

Finalmente se pipetearon 500 µL de cada una de las orinas fortificadas sobre rectángulos de 17x19 mm cortados de tarjetas de papel de filtro Whatman 903, colocados sobre una superficie hidrófoba, y se prosiguió la preparación de los correspondientes *DUS* de la forma expuesta para los *DUS* de difusión controlada (*PS-DUS*).

II.4.3. Patrones para la determinación multielemental en orina retenida en un *PS-DUS* con calibración externa.

Adición del patrón interno antes de la preparación del PS-DUS.

1) Se partió de la orina de un paciente sano cuyo contenido en los analitos de interés se determinó por *ICP-MS* con nebulización neumática, resultando inapreciable para la mayoría de los elementos y muy bajo en los restantes (5-20 µg L^{-1}). A distintas fracciones de 1 mL de la misma se le adicionaron pequeños volúmenes variables (en todos los casos menos del 3% del volumen de orina, con objeto de minimizar la modificación de la matriz) de una disolución patrón de los elementos objeto de estudio (obtenida por mezcla y dilución de los patrones acuosos de 1 g L^{-1} de estos elementos) para obtener las concentraciones finales deseadas (entre 5-500 µg L^{-1}).

2) Posteriormente se añadieron 10 µL de una disolución patrón de platino (que se utiliza como patrón interno) de 10 mg L^{-1}.

3) Finalmente se pipetearon 300 µL de cada una de las orinas fortificadas sobre discos de 16 mm troquelados de tarjetas de papel de filtro Whatman 903, colocados sobre una superficie hidrófoba, y se prosiguió la preparación de los correspondientes *DUS* de la forma expuesta para los *DUS* de difusión controlada (*PS-DUS*).

Adición del patrón interno después de la preparación del PS-DUS.

1) Igual que en la sección anterior.

2) Igual que el apartado 3) de la sección anterior.

3) Sobre los *PS-DUS* secos y colocados sobre una superficie hidrófoba se depositaron 300 µL de una disolución de platino de 100 µg L^{-1} y se dejaron secar al aire durante al menos cuatro horas.

II.4.4. Patrones para la determinación multielemental en orina retenida en un *PS-DUS* con calibración mediante dilución isotópica.

Adición del patrón interno antes de la preparación del PS-DUS.

1) Se preparó una disolución de patrones enriquecidos isotópicamente mezclando 10 µL de disolución de ^{nat}Cd de 1 g L^{-1}, 40 µL de disolución de ^{nat}Cu de 1 g L^{-1}, 20 µL de disolución de ^{nat}Pb de 1 g L^{-1}, 1 mL de disolución de ^{111}Cd-enriquecido de aproximadamente 4 mg L^{-1}, 5 mL de disolución de ^{65}Cu-enriquecido de aproximadamente 2.5 mg L^{-1}, 15 µL de disolución de ^{206}Pb-enriquecido de aproximadamente 2 g L^{-1} y la subsiguiente adición HNO_3 0.14 M para obtener un volumen final de 10 mL. La composición isotópica exacta de esta disolución se determinó por dilución isotópica inversa con

ICP-MS de sector magnético y nebulización neumática, obteniéndose unas concentraciones de 1.13 µmol de $^{113}Cd\ L^{-1}$, 4.86 µmol de $^{111}Cd\ L^{-1}$, 38.8 µmol de $^{65}Cu\ L^{-1}$, 45.3 µmol de $^{63}Cu\ L^{-1}$, 5.92 µmol de $^{208}Pb\ L^{-1}$ y 19.5 µmol de $^{206}Pb\ L^{-1}$.

2) Se tomó un mililitro del material de referencia *Clincheck Urine Control Level II*, se le adicionaron 10 µL de la disolución de los patrones enriquecidos isotópicamente y se homogeneizó la mezcla.

3) Se pipetearon 300 µL de la misma sobre un disco de 16 mm troquelado de tarjetas de papel de filtro Whatman 903 colocado sobre una superficie hidrófoba y se prosiguió la preparación del correspondiente *DUS* de la forma expuesta para los *DUS* de difusión controlada (*PS-DUS*).

Adición del patrón interno después de la preparación del PS-DUS.

1) Igual que en la sección anterior.

2) Se pipetearon 300 µL del material de referencia *Clincheck Urine Control Level II* sobre un disco de 16 mm troquelado de tarjetas de papel de filtro Whatman 903, colocado sobre una superficie hidrófoba, y se dejó secar al aire durante al menos cuatro horas.

3) Sobre los *PS-DUS* secos y colocados sobre una superficie hidrófoba se depositaron 300 µL de la disolución de los patrones enriquecidos isotópicamente, diluida cien veces; se dejó secar al aire durante al menos cuatro horas y se prosiguió la preparación del correspondiente *DUS* de la forma expuesta para los *DUS* de difusión controlada (*PS-DUS*).

II.5. Procedimientos operativos.

II.5.1. Determinación de plomo en sangre venosa líquida.

Las medidas se realizaron mediante los espectrofotómetros Perkin-Elmer modelo 4110ZL y Analytik Jena modelo ZEEnit 600. Para realizar estas determinaciones se sigue el protocolo habitual, descrito en la guía C-40A del NCCLS [8]. La sangre líquida se diluye diez veces con un modificante de matriz que contiene fosfato (0.2% p/v de $NH_4H_2PO_4$), Triton X-100 (0.5% v/v) y ácido nítrico (0.2% v/v). Se introducen 12 µL de la muestra diluida en el horno de grafito y se procede a la medida de la absorción atómica del plomo.

Estas determinaciones las realizó la Dra. Luisa Calvo Ruata de la Unidad de Metales del Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Miguel Servet de Zaragoza, laboratorio que en aquellas fechas participaba en un ensayo de aptitud (*Proficiency Testing*) internacional para la determinación de plomo (Programa Interlaboratorios de Control de Calidad de Plomo en sangre).

II.5.2. Determinación de plomo en sangre retenida en un *DBS*.

Las medidas se realizaron mediante los espectrofotómetros AAS 5 EA (Apartado III.1) y ContrAA 700 (Apartado III.2), ambos de Analytik Jena. Sobre la plataforma que se introduce en la cámara de grafito se depositan 10 µL de la disolución de modificante químico (disolución de platino de 5 mg L^{-1}) y sobre ella se coloca el disco de 3.2 mm de diámetro (que puede ser un *DBS*, un patrón de calibrado o un *blanco*) presionando ligeramente por medio de una aguja de forma que se logre un contacto profundo entre el disco y la disolución del modificante y, además, se fije la posición de aquél en la plataforma de forma suficientemente reproducible. Invertir el orden de adición lleva a resultados mucho menos reproducibles.

La plataforma se transfiere de forma automática al horno de grafito donde se somete al consiguiente programa de atomización y medida de la absorción atómica del plomo como absorbancia integrada en las condiciones que se indican en las Tablas II.2 y II.3. Finalizado el proceso, y tras la salida automática de la plataforma del horno de grafito, sobre aquélla persiste un pequeño residuo carbonoso muy compacto que, al no estar adherido a la plataforma, se elimina fácilmente mediante una aguja.

Tabla II.2. Parámetros instrumentales para la determinación de plomo en sangre retenida en los *DBS* con el espectrofotómetro AAS 5 EA.

Instrumento	AJ-AAS 5 EA
Longitud de onda (nm)	217.0
Anchura de rendija (nm)	0.5
Flujo de argón durante la atomización (mL min^{-1})	0*
Corrección de absorción inespecífica	D_2
Modificante químico	50 ng de Pt
Peso de muestra (mg)	disco de papel de filtro de 3.2 mm de diámetro (≈1.5 mg) embebidos en sangre (≈0.8 mg)

Programa de temperaturas

	Temperatura (ºC)	Rampa (ºC/s)	Estancia (s)
Etapa de secado	200	7	35
Etapa de pirólisis	800	100	30
Etapa de autocero	800	0	4
Etapa de atomización	2000	2000	5
Etapa de limpieza	2500	1000	3

* Linealidad hasta 450 µg L^{-1}. El uso de flujo mínimo durante la atomización (0.1 L de Ar min^{-1}) permite expandir el rango lineal hasta por lo menos 837 µg L^{-1}.

Tabla II.3. Parámetros instrumentales para la determinación de plomo en sangre retenida en los *DBS* con el espectrofotómetro ContrAA 700.

Instrumento	AJ-ContrAA 700
Longitud de onda (nm)	217.001
Número de píxeles del detector sumados por línea	3 centrales (aproximadamente 3.64 pm)*
Flujo de argón durante la atomización (mL min^{-1})	0
Modificante químico	50 ng de Pt
Peso de muestra (mg)	disco de papel de filtro de 3.2 mm de diámetro (≈1.5 mg) embebidos en sangre (≈0.8 mg)

Programa de temperaturas

	Temperatura (ºC)	Rampa (ºC/s)	Estancia (s)
Etapa de secado	200	7	35
Etapa de pirólisis	800	100	30
Etapa de autocero	800	0	4
Etapa de atomización	2000	2000	5
Etapa de limpieza	2500	1000	3

* Linealidad hasta 239 µg L^{-1}. Se pueden utilizar los píxeles laterales 98+104 para expandir el rango lineal hasta al menos 837 µg L^{-1}.

Al inicio de cada sesión de medida se obtiene la curva de calibrado utilizando los patrones emparejados preparados como se ha indicado en el Apartado II.4.1 y se mide un blanco y tres patrones (preparados como *DBS*) antes de proceder al análisis de las muestras. Cada veinte determinaciones se vuelve a medir un patrón a fin de detectar y corregir posibles derivas de sensibilidad.

Para cada determinación se realizan cinco medidas, consideradas réplicas, con cinco discos de 3.2 mm de diámetro procedentes del mismo *DBS* y se toma la mediana de las mismas como valor representativo para tratar de minimizar la posible influencia de resultados anómalos [9]. El tiempo necesario para realizar estas medidas es de aproximadamente diez minutos.

II.5.3. Método de criba de plomo en sangre retenida en un *DBS*.

El procedimiento operativo es idéntico al de la determinación de plomo, salvo que se utiliza únicamente el espectrofotómetro ContrAA 700 y que se realizan sólo tres réplicas para cada muestra.

II.5.4. Determinación simultánea de titanio y molibdeno en orina retenida en un *PS-DUS*.

Las medidas se realizaron con el espectrofotómetro ContrAA 700 de Analytik Jena. Sobre la plataforma que se introduce en la cámara de grafito se depositan 10 µL de la disolución de modificante químico (disolución de platino de 100 mg L^{-1}) y sobre ella se coloca el disco de 3.2 mm de diámetro (que puede ser un *DUS*, un patrón de calibrado o un *blanco*) presionando ligeramente por medio de una aguja de forma que se logre un contacto profundo entre el disco y la disolución del modificante y, además, se fije la posición de aquél en la plataforma de forma suficientemente reproducible. Invertir el orden de adición lleva a resultados mucho menos reproducibles.

La plataforma se transfiere de forma automática al horno de grafito donde se somete al consiguiente programa de atomización y medida simultánea de la absorción atómica del titanio y del molibdeno (como absorbancias integradas) en las condiciones que se indican en la Tabla II.4. Finalizado el proceso, y tras la salida automática de la plataforma del horno de grafito, sobre aquélla persiste un pequeño residuo, aunque mucho menos consistente que en el caso de los *DBS*, que se elimina mediante una aguja.

Al inicio de cada sesión de medida se obtiene la curva de calibrado utilizando los patrones emparejados preparados como se ha indicado en el Apartado II.4.2 y se mide un blanco y dos patrones (preparados como *PS-DUS*) antes de proceder al análisis de las muestras. Para cada determinación se realizan tres medidas, consideradas réplicas, con tres discos de 3.2 mm de diámetro procedentes del mismo *PS-DUS* y se toma la mediana de las mismas como valor representativo para tratar de minimizar la posible influencia de resultados anómalos. El tiempo necesario para realizar estas medidas es de aproximadamente diez minutos.

Tabla II.4. Parámetros instrumentales para la determinación simultánea de titanio y molibdeno en orina retenida en los *PS-DUS*.

Instrumento	AJ-ContrAA 700		
Longitud de onda (nm)	319.200 (Ti) y 319.397 (Mo)		
Número de píxeles del detector sumados por línea	3 centrales (aprox. 5.85 pm)		
Flujo de argón durante la atomización (mL min^{-1})	0		
Modificante químico	1 µg de Pt		
Peso de muestra (mg)	disco de papel de filtro de 3.2 mm de diámetro (≈1.5 mg) embebidos en orina*		
Programa de temperaturas			
	Temperatura (ºC)	Rampa (ºC/s)	Estancia (s)
Etapa de secado	200	5	30
Etapa de pirólisis	350	10	20
Etapa de pirólisis	1400	300	20
Etapa de autocero	1400	0	5
Etapa de atomización	2650	1500	15
Etapa de limpieza	2700	500	4

* El peso de los discos de 3.2 mm sin orina no es significativamente diferente de los discos provenientes de *PS-DUS* que contienen orina seca.

II.5.5. Determinación multielemental en orina líquida.

La determinación de elementos traza en las muestras reales de orina se realizó mediante *ICP-MS* con nebulización neumática, para lo que se utilizó un *ICP-MS* Thermo Element XR de *Thermo Scientific* trabajando en las condiciones que aparecen resumidas en la Tabla II.5. Se siguió un procedimiento convencional tras diluir la muestra 10 veces con HNO_3 0.14 M y la curva de calibrado se construyó midiendo un blanco y 6 disoluciones patrón de entre 1 y 50 µg L^{-1}. Tanto las muestras como el blanco y los patrones de calibrado se doparon con una disolución patrón de rodio, que se utilizó como patrón interno, hasta una concentración final del mismo de 10 µg L^{-1}. Todas las medidas (blanco, patrones y muestras) se realizaron por triplicado tomando como resultado la media de las mismas.

Tabla II.5. Parámetros instrumentales para la determinación multielemental en orina líquida.

Instrumento	Thermo Element XR
Intensidad de radiofrecuencias	1200 W
Caudal de gas plasmógeno/gas auxiliar	Ar (15.0/1.0 L min^{-1})
Caudal de gas portador	Ar (0.958 L min^{-1})
Flujo del nebulizador	200 µL min^{-1}
Modo de escaneo	E-Scan
Tiempo de adquisición por punto	10 ms
Número de puntos de adquisición por pico	10 (modo baja resolución) 20 (modo media resolución)
Anchura de pico integrada	50% (modo baja resolución) 40% (modo media resolución)
Número de escaneos por réplica	10
Número de réplicas por medida	3
Isótopos monitorizados en baja resolución	$^{9}Be^{+}$, $^{103}Rh^{+}$ $^{111}Cd^{+}$, $^{118}Sn^{+}$, $^{121}Sb^{+}$, $^{205}Tl^{+}$, $^{206}Pb^{+}$, $^{209}Bi^{+}$
Isótopos monitorizados en resolución media (principales interferencias poliatómicas)	$^{51}V^{+}$($^{35}Cl^{16}O^{+}$), $^{59}Co^{+}$($^{36}Ar^{23}Na^{+}$, $^{43}Ca^{16}O^{+}$), $^{60}Ni^{+}$($^{44}Ca^{16}O^{+}$, $^{23}Na^{37}Cl^{+}$), $^{63}Cu^{+}$($^{40}Ar^{23}Na^{+}$, $^{38}Ar^{25}Mg^{+}$), $^{103}Rh^{+}$

II.5.6. Determinación multielemental en orina retenida en un *PS-DUS* con calibración externa.

Las medidas se realizaron utilizando un láser excímero UP193HE de New Wave Research acoplado a un *ICP-MS* Thermo Element XR de Thermo Scientific. A lo largo de todo el estudio se utilizó la celda de ablación estándar (30 cm^3) que tiene capacidad para albergar simultáneamente hasta cuatro discos de *PS-DUS* de 16 mm de diámetro. Los parámetros instrumentales utilizados, ajustados para obtener la máxima sensibilidad y robustez del plasma y mínima influencia de interferencias, están recogidos en la Tabla II.6.

La ablación se realiza dentro del área de 9x9 mm en el centro de los *PS-DUS* para evitar la influencia del enriquecimiento cromatográfico de los analitos en el borde de los discos y se prolonga durante 40 segundos. Los primeros 10 segundos se realizan con el obturador del láser cerrado y estas señales se utilizan como blancos del gas portador; tras 5 segundos para la estabilización de la señal, los 25 últimos segundos, que proporcionan una señal cuasi-estable, se utilizan para la obtención de las señales analíticas promediadas para cada uno de los distintos elementos.

Al inicio de cada sesión de medida se obtiene la curva de calibrado utilizando los patrones emparejados preparados como se ha indicado en el Apartado II.4.3 y después se procede a la ablación de las muestras. Para la obtención de todos los resultados analíticos se utilizan intensidades de señal netas, es decir, corregidas por la contribución del blanco de gas y normalizadas con respecto a la señal del $^{195}Pt^{+}$. Tanto para los patrones como para las muestras se realizan tres medidas replicadas obtenidas sobre un único *PS-DUS* y se calcula la media de las mismas.

Tabla II.6. Parámetros instrumentales para la determinación multielemental en orina en los *PS-DUS*.

Parámetros de ablación láser	
Instrumento	New Wave UP193HE
Longitud de onda	193 nm
Duración del pulso	20 ns
Frecuencia	20 Hz
Diámetro del haz láser	400 µm
Fluencia	0.8 – 1.6 J cm^{-2}
Estrategia de ablación	En líneas. Velocidad de traslación 400 µm s^{-1}
Tiempo de ablación por réplica	40 s (10 s blanco del gas portador, 5 s estabilización de la señal, 25 s integración de la señal analítica)
Caudal de gas portador a través de la celda	He (0.5 – 0.7 L min^{-1}, optimizado diariamente)
Parámetros del *ICP-MS*	
Instrumento	Thermo Element XR
Intensidad de radiofrecuencias	850 W
Caudal de gas plasmógeno/gas auxiliar	Ar (15.0/1.0 L min^{-1})
Caudal de gas portador	Ar (0.5 – 0.7 L min^{-1}, optimizado diariamente)
Modo de escaneo	E-Scan
Tiempo de asentamiento del detector	1 ms
Tiempo de adquisición por punto	5 ms
Número de puntos adquiridos por pico	5 (modo baja resolución) 7 (modo media resolución)
Anchura del pico integrada	5% (modo baja resolución) 50% (modo media resolución)
Tiempo de adquisición por réplica	55 s
Isótopos monitorizados en baja resolución	$^{9}Be^{+}$, $^{111}Cd^{+}$, $^{118}Sn^{+}$, $^{121}Sb^{+}$, $^{195}Pt^{+}$, $^{205}Tl^{+}$, $^{206}Pb^{+}$, $^{209}Bi^{+}$
Isótopos monitorizados en resolución media (principales interferencias poliatómicas)	$^{51}V^{+}(^{35}Cl^{16}O^{+})$, $^{59}Co^{+}(^{36}Ar^{23}Na^{+}, ^{43}Ca^{16}O^{+})$, $^{60}Ni^{+}(^{44}Ca^{16}O^{+}, ^{23}Na^{37}Cl^{+})$, $^{63}Cu^{+}(^{40}Ar^{23}Na^{+}, ^{38}Ar^{25}Mg^{+})$, $^{195}Pt^{+}$

La medida de los analitos en resolución baja y media fue realizada de forma secuencial en experimentos separados.

II.5.7. Determinación multielemental en orina retenida en un *PS-DUS* con calibración mediante dilución isotópica.

La instrumentación y condiciones de trabajo fueron las mismas que en el apartado anterior salvo que se monitorizaron los isótopos: ^{113}Cd, ^{111}Cd, ^{208}Pb y ^{206}Pb en modo de baja resolución, y ^{65}Cu y ^{63}Cu en resolución media.

Para cada determinación se realiza la medida secuencial de tres réplicas de los *PS-DUS* correspondientes a: a) la muestra (*Clincheck Urine Control Level II*); b) la disolución de patrones enriquecidos isotópicamente; c) la mezcla de la muestra con la disolución de patrones enriquecidos isotópicamente.

Los tres valores de relación isotópica obtenidos para la muestra (a) y los patrones enriquecidos isotópicamente (b) se promedian y los dos valores medios se utilizan para el cálculo de la concentración del analito en las tres réplicas de la mezcla de la muestra con la disolución de patrones enriquecidos (c). El resultado final se calcula como la media de estos

tres últimos valores. En todos los casos se utilizan intensidades de señal netas, es decir, corregidas de la contribución del blanco de gas.

II.5.8. Determinación de cobre en orina líquida.

Las medidas se realizaron mediante el espectrofotómetro Analytik Jena modelo ZEEnit 600. Para realizar las determinaciones se sigue un procedimiento convencional, adaptado del publicado por Almeida y Lima [10]. La orina líquida se diluye 5 veces con un modificante de matriz que contiene fosfato (0.2% p/v de $NH_4H_2PO_4$), Triton X-100 (0.5% v/v) y ácido nítrico (0.2% v/v). Se introducen 12 µL de la muestra diluida en el horno de grafito y se procede a la medida de la absorción atómica del cobre.

Al igual que las medidas de plomo en sangre líquida descritas en el Apartado II.5.1, estas determinaciones las realizó la Dra. Luisa Calvo Ruata, del Hospital Universitario Miguel Servet.

II.5.9. Determinación de la relación isotópica 65Cu/63Cu en orina retenida en un *PS-DUS*.

Las medidas se realizaron utilizando un láser de femtosegundo Lambda 3 acoplado a un *ICP-MS* con detectores multicolectores Nu Plasma de Nu Instruments. Los parámetros instrumentales utilizados se resumen en la Tabla II.7.

Tabla II.7. Parámetros instrumentales para la determinación de la relación isotópica de cobre en orina en los *PS-DUS*.

Parámetros de ablación láser	
Instrumento	Lambda 3 femtosecond
Longitud de onda	257 nm
Duración del pulso	360 fs
Frecuencia	10 000 Hz
Diámetro del haz láser	8 µm
Fluencia	19 J cm^{-2}
Estrategia de ablación	Coronas (150 µm de ancho compuestas por 20 círculos concéntricos). Velocidad de traslación 10 mm s^{-1}
Caudal de gas portador a través de la celda	He (0.5 L min^{-1})
Parámetros del *ICP-MS*	
Instrumento	Nu MC-ICPMS
Intensidad de radiofrecuencias	1300 W
Caudal de gas plasmógeno/gas auxiliar	Ar (13.0/0.80 L min^{-1})
Caudal de gas nebulizador	Ar (0.80 L min^{-1})
Resolución instrumental	*Pseudo* alta resolución ~ 5700 m/Δm
Anchura de rendija de la fuente	0.05 mm
Rendija alfa 1	80 mA
Rendija alfa 2	90 mA
Tiempo de integración por punto	5 s

Configuración de las copas de Faraday de detección															
Copa	H7	H6	H5	H4	H3	H2	H1	Ax	L1	L2	IC0	L3	IC1	IC2	L4
m/z	65					63			62			61			

Los *PS-DUS* se fijaron convenientemente en la celda de ablación utilizando un pequeño trozo de cinta adhesiva de doble cara. Como esquema de ablación se utilizan coronas de 150 µm de ancho compuestas por 20 círculos concéntricos, comenzando por el borde de los *PS-DUS* para aprovechar el enriquecimiento cromatográfico de los analitos en el mismo. Con esta estrategia de ablación se obtiene una señal de aproximadamente 100 s de duración. Se realizan 5 coronas por muestra que se consideran réplicas y durante la medida de cada réplica se nebuliza simultáneamente una disolución de níquel para la corrección del efecto de discriminación de masa instrumental como se detalla a continuación.

Para calcular las relaciones isotópicas del cobre a partir de las señales obtenidas se utilizó el método de la pendiente de la recta de regresión, representando la intensidad de la señal para el ^{65}Cu frente a la del ^{63}Cu. La pendiente de la recta de regresión así obtenida proporciona la relación $^{65}Cu/^{63}Cu$ bruta [11-13], que se corrige posteriormente para compensar el sesgo de discriminación de masa instrumental aplicando la ley exponencial de Russell [14]. Dicha ley se basa en calcular un parámetro corrector para la relación isotópica $^{65}Cu/^{63}Cu$ medida experimentalmente, de modo que la relación corregida es igual a la relación medida multiplicada por este parámetro corrector, que se define como la masa exacta del isótopo más pesado (^{65}Cu) dividida por la masa exacta del isótopo más ligero (^{63}Cu) elevada a un parámetro ß.

$$\left(\frac{^{65}Cu}{^{63}Cu}\right)_{corregida} = \left(\frac{^{65}Cu}{^{63}Cu}\right)_{experimental} \times \left(\frac{masa\ ^{65}Cu}{masa\ ^{63}Cu}\right)^{\beta}$$

Este parámetro ß puede estimarse experimentalmente como el logaritmo neperiano de la relación ^{62}Ni/^{61}Ni medida para el patrón interno nebulizado con las muestras dividido por la relación ^{62}Ni/^{61}Ni real y todo ello dividido por el logaritmo neperiano del cociente entre la masa exacta del ^{62}Ni y la del ^{61}Ni.

$$\beta = \frac{\ln\left[\frac{\left(\frac{^{62}Ni}{^{61}Ni}\right)_{medido}}{\left(\frac{^{62}Ni}{^{61}Ni}\right)_{real}}\right]}{\ln\left(\frac{masa\ ^{62}Ni}{masa\ ^{61}Ni}\right)}$$

Para la estimación del parámetro ß se utilizó la relación ^{62}Ni/^{61}Ni esperada para una muestra de níquel de composición isotópica natural [15], dado que la composición isotópica de la solución comercial de níquel utilizada como patrón no está certificada. Como consecuencia, la relación isotópica absoluta ^{65}Cu/^{63}Cu no puede determinarse aunque sí pueden obtenerse conclusiones de tipo médico por comparación de los resultados obtenidos para las distintas muestras.

II.6. Bibliografía

[1] K.-C. Friese, V. Krivan. A solid-sampling system for a transversely heated graphite furnace and its application to trace element analysis of high-purity tantalum powders by atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, 1998, 53, 1069–1078.

[2] B. Welz, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann. High-Resolution Continuum Source AAS: the Better Way to Do Atomic Absorption Spectrometry. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2005.

[3] C. Pécheyran, S. Cany, P. Chabassier, E. Mottay, O.F.X. Donard. High repetition rate and low energy femtosecond laser ablation coupled to ICPMS detection: a new analytical approach for trace element determination in solid samples. *J. Phys.: Conf. Ser.*, 2007, 59, 112–117.

[4] E. Ricard, C. Pécheyran, G. Sanabria Ortega, A. Prinzhofer, O.F.X. Donard. Direct analysis of trace elements in crude oils by high-repetition-rate femtosecond laser ablation coupled to ICPMS detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 399, 2153–2165.

[5] G. Ballihaut, L. Tastet, C. Pécheyran, B. Bouyssiere, O. Donard, R. Grimaud, R. Lobinski. Biosynthesis, purification and analysis of selenomethionyl calmodulin by gel electrophoresis-laser ablation-ICP-MS and capillary HPLC-ICP-MS peptide mapping following in-gel tryptic digestion. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2005, 20, 493–499.

[6] G. Ballihaut, F. Claverie, C. Pécheyran, S. Mounicou, R. Grimaud, R. Lobinski. Sensitive detection of selenoproteins in gel electrophoresis by high repetition rate femtosecond laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 2007, 79, 6874–6880.

[7] W.H. Hannon, R.J. Whitley, B. Davin, P. Fernhoff, T. Halonen, M. Lavochkin, J. Miller, J. Ojodu, B.L. Therrell. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Blood collection on filter paper for newborn screening programs; approved standard—fifth edition. CLSI document LA4-A5 (ISBN 1-56238-644-1). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007.

[8] P.J. Parsons, J.J. Chisolm, H.T. Delves, R. Griffin, E.W. Gunter, W. Slavin, N. V. Stanton, R. Vocke. Analytical Procedures for the Determination of Lead in Blood and Urine; Approved Guide- line, NCCLS document C40-A (ISBN 1-56238-437-6), NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087–1898 USA, 2001.

[9] M.A. Belarra, M. Resano, J.R. Castillo. Theoretical evaluation of solid sampling-electrothermal atomic absorption spectrometry for screening purposes. *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, 14, 547–552.

[10] A. Almeida, J. Lima. Optimized conditions and analytical performance for the determination of Cu in serum and urine samples using a single GFAAS procedure. *At. Spectrosc.*, 2001, 22, 324–330.

[11] J. Fietzke, V. Liebetrau, D. Günther, K. Gürs, K. Hametner, K. Zumholz, T.H. Hansteen, A. Eisenhauer. An alternative data acquisition and evaluation strategy for improved isotope ratio precision using LA-MC-ICP-MS applied to stable and radiogenic strontium isotopes in carbonates. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2008, 23, 955–961.

[12] J. Fietzke, M. Frische, T.H. Hansteen, A. Eisenhauer. A simplified procedure for the determination of stable chlorine isotope ratios (δ^{37}Cl) using LA-MC-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2008, 23, 769–772.

[13] V.N. Epov, S. Bérail, M. Jimenez-Moreno, V. Perrot, C. Pécheyran, D. Amouroux, O.F.X. Donard. Approach to measure Isotopic ratios in species using multicollector-ICPMS coupled with chromatography. *Anal. Chem.*, 2010, 82, 5652–5662.

[14] F. Vanhaecke, L. Balcaen, D. Malinovsky. Use of single-collector and multi-collector ICP-mass spectrometry for isotopic analysis. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2009, 24, 863–886.

[15] M. Berglund, M.E. Wieser. Isotopic compositions of the elements 2009 (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 2011, 83, 397–410.

III. Resultados y discusión

III.1. Determinación directa de plomo en sangre en los *DBS* mediante *GF-AAS* con fuente de línea.

> "Si fuésemos a juzgar el interés que genera cualquier tema médico por el número de escritos a los que da lugar, no podríamos dejar de considerar el envenenamiento por plomo como el más importante de todos" (M. J. B. Orfila, 1817).

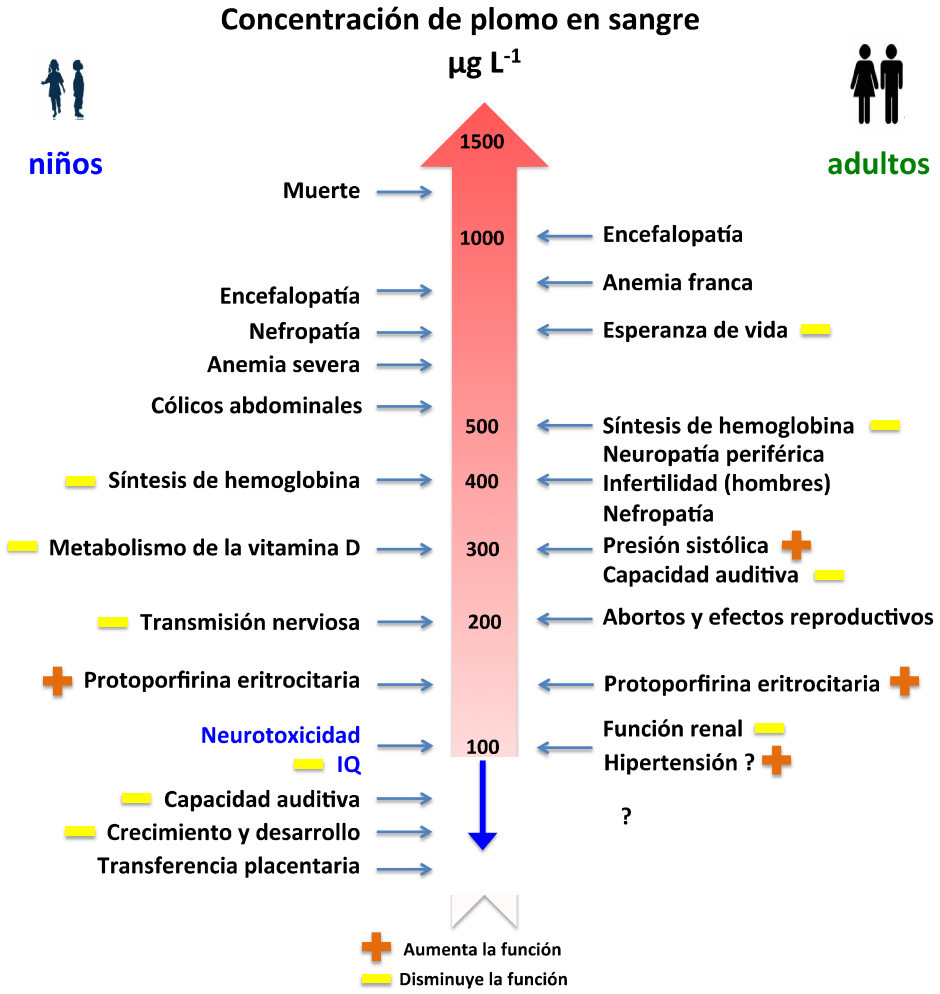
La incidencia de la exposición al plomo en la salud humana se conoce desde hace milenios, pues ya hay referencias a la intoxicación por este elemento en el antiguo Egipto, 4.000 años antes de Cristo. A finales del siglo XIX el enorme desarrollo industrial favoreció el incremento del saturnismo que pasó a ocupar en 1915 el primer lugar de la lista de enfermedades profesionales.

Como es lógico, las vías de exposición al plomo (respiratoria y digestiva) son consecuencia de sus principales aplicaciones industriales. Así, el plomo puede entrar en los sistemas biológicos (como Pb^{2+}) vía alimentos (comida enlatada contaminada por el uso de soldaduras con plomo o conservación de encurtidos y bebidas en vasijas de barro contaminado), agua (cañerías de plomo), aire y suelo (por la combustión de combustibles plomados) y, además, en EEUU y otros países, la mayor fuente de ingestión en población infantil han sido los restos y desconchados de paredes pintadas antes de que se prohibiera el uso de plomo en pinturas [1].

La intoxicación por plomo es una enfermedad crónica debida a su acumulación en el organismo, en el curso de la cual pueden producirse, o no, episodios con sintomatología aguda que normalmente coinciden con periodos de sobre-exposición activa. Los síntomas clínicos de la intoxicación por plomo son inespecíficos por lo que, para su diagnóstico, es esencial el análisis de los niveles de plomo del paciente, preferentemente en sangre (*BLL*, *Blood Lead Levels*). La relación entre la concentración de plomo en sangre y los síntomas clínicos que genera se refleja en la Figura III.1.1 [2].

El plomo es un tóxico que afecta fundamentalmente los sistemas nervioso central y periférico, a la vía de síntesis del grupo hemo y al sistema renal. Aunque no se conocen con detalle los mecanismos moleculares, parece que el plomo se une a los residuos sulfhidrilos de proteínas ricas en cisteínas e interfiere las acciones intracelulares del Ca^{2+} [3], que resultan indispensables para multitud de procesos bioquímicos, entre ellos los de transducción de señales [1].

Figura III.1.1. Manifestaciones clínicas producidas por el plomo en función de su concentración sanguínea en niños y en adultos.



En la actualidad las intoxicaciones agudas, con riesgo para la vida, son muy poco frecuentes, aunque son un peligro siempre latente. Como ejemplo, durante el año 2011, la Sección de Metales del Hospital Universitario Miguel Servet diagnosticó dos casos de intoxicación aguda después de que los pacientes sufrieran un periplo de meses, por consultas de distintas especialidades médicas, sin dar con la etiología responsable de los síntomas que sufrían [4].

Por el contario, el nivel de plomo en la sangre de los niños sigue siendo un tema de enorme preocupación, pues cada vez existen más evidencias de que disminuye su capacidad intelectual [5]. Los niños pequeños tienen más ocasiones de exposición al plomo que los adultos (tendencia a llevarse objetos a la boca, proximidad al suelo cuando gatean) y, además, su absorción intestinal es mucho más elevada, ya que pueden absorber el 50% del plomo tomado por la dieta e incluso más si va acompañado de deficiencia nutricional de hierro, cinc o calcio.

La mayoría de estudios epidemiológicos [6-8] han confirmado que los *BLL* alcanzan un máximo aproximadamente a los 2 años de edad y luego disminuyen sin ninguna intervención. A esta edad, el sistema nervioso todavía en desarrollo, es bastante más vulnerable a los efectos tóxicos del plomo que el cerebro maduro.

Los *BLL* elevados en niños están asociados con un menor cociente intelectual de entre 2 y 7 puntos [1] y pueden afectar al comportamiento de forma que suelen ser niños menos atentos, hiperactivos, desorganizados y menos capaces de seguir directrices. Tras un seguimiento a lo largo de los años se han constatado mayores tasas de fracaso escolar e incluso delincuencia adolescente, aunque no está claro que estos comportamientos estén causados directamente por el plomo o sean efectos secundarios de sus dificultades cognitivas [5,6].

Hasta el año 2012, el valor límite de *BLL* en niños que se consideraba que podría provocar efectos tóxicos, había sido establecido en 100 µg L^{-1} (*nivel de preocupación*) por el *Centers for Disease Control and Prevention*. Aunque hoy en día todavía un porcentaje significativo de niños de países en vías de desarrollo y del tercer mundo presentan *BLL* por encima de este umbral (por ejemplo, es uno de los problemas pediátricos más comunes en China, un país en el que rebasaban el nivel de preocupación un 38% de los niños en 1998) [9-11], en los países desarrollados este número se ha reducido considerablemente [1,12].

De todo lo expuesto se deduce que la determinación del *BLL* sea una actividad habitual de los laboratorios clínicos y la forma habitual de realizarla es sobre sangre venosa siguiendo el protocolo que se ha descrito en el Apartado II.5.1.

La determinación de plomo en sangre en los DBS.

En el Apartado I.2 ya se han comentado las características generales de las aplicaciones analíticas realizadas en sangre depositada sobre papel de filtro (*DBS*). Su primera aplicación a la determinación de plomo se remonta a 1970 [13,14] y aunque el trabajo de Delves, una aproximación muy sencilla en la que el papel de filtro se insertaba en una llama usando un crisol de platino, alcanzó cierta notoriedad en el mundo académico de la absorción atómica (la *copa de Delves*), su incidencia en los laboratorios clínicos fue insignificante.

En la última década del siglo pasado se hicieron nuevas propuestas en esta metodología. Así, Verebey *et al*. propusieron una modificación del método de Delves introduciendo una etapa de incineración del papel antes de su introducción en la llama [15]. Otros investigadores presentaron trabajos más innovadores basados en la mayor sensibilidad que la atomización en horno de grafito ofrece sobre la atomización en llama. Ahora bien, esos trabajos exigían que la muestra estuviera disuelta por lo cual tenían que introducir una etapa de extracción o digestión para liberar al analito del papel de filtro.

Esta etapa constituyó el principal escollo de esos métodos ya que, en esos años, la determinación de plomo en disolución mediante *GF-AAS* no presentaba ninguna dificultad especial. En el método descrito por Wang y Demshar [16], se realizaba la extracción con $(NH_4)_2HP_4$-Triton X-100 y se realizaban las medidas por *GF-AAS* calibrando con patrones de base sanguínea. Por su parte, Yee *et al.* [17,18] utilizando la misma técnica analítica pero realizando el calibrado con patrones acuosos, prefirieron el uso de HNO_3-Triton X-100 como disolución extractante.

Estos trabajos no pasaron inadvertidos para la comunidad clínica. De hecho, la calidad de los resultados analíticos que se podían obtener con los métodos desarrollados fue motivo de una controversia, en ocasiones bastante agria, en publicaciones clínicas de finales del siglo pasado [19-28].

En 1999 se realizó una prueba de competencia sobre la determinación de plomo en sangre en los *DBS*, según los requisitos del CLIA'88 (*Clinical Laboratory Improvement Amendments*) [25]. Los tres laboratorios que utilizaron el método de Wang y Demshar lograron cumplir los citados requisitos, mientras que los dos laboratorios que utilizaron el de Yee *et al*. presentaron un error sistemático negativo. Lo mismo sucedió con el único laboratorio que utilizó la modificación de Verebey *et al*. del antiguo método de Delves.

Más recientemente se han publicado trabajos en los que las medidas finales se realizan mediante *ICP-MS*, pero manteniendo la etapa de extracción previa. Mientras Wong *et al.* se limitan a la determinación del plomo [29], los trabajos de este siglo hacen uso de las capacidades multielementales de la técnica. Así, Chaudhuri *et al*. han descrito la determinación conjunta de los elementos tóxicos plomo, mercurio y cadmio, utilizando como disolución de extracción ácido clorhídrico (2%), 2-mercaptoetanol (0.05%) y L-cisteína (0.001%) [30]. En otro trabajo posterior, Langer *et al*. señalan que los mejores rendimientos de extracción se obtienen con un ácido más un surfactante, en concreto con ácido nítrico al 5% (v/v) y Tritón X-100 al 0.1% (v/v) [31].

Tampoco estos trabajos gozan de general reconocimiento. El de Wong *et al*. no parece ofrecer mejores resultados que los contemporáneos realizados con *GF-AAS* [24], mientras que en el de Langer *et al*. más del 80% de las muestras analizadas quedan por debajo del límite de detección del plomo.

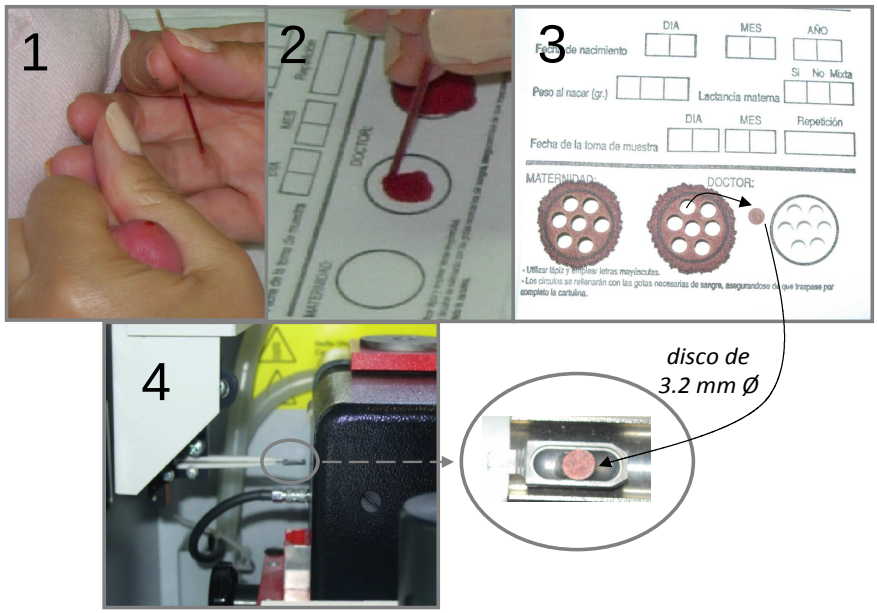
El recelo con que la comunidad clínica contempla la determinación de plomo en sangre en los *DBS* queda reflejada en la postura oficial de la *American Academy of Pediatrics* (2005) según la cual la medida de las concentraciones sanguíneas de plomo “es mejor realizarla en una muestra venosa, pero también puede utilizarse una muestra capilar recogida de forma cuidadosa mediante pinchazo en el dedo con una lanceta” [7].

No cabe duda de que el proceso para liberar al analito del *DBS*, además de alargar el proceso y provocar una pérdida de sensibilidad, puede producir problemas de incompleta recuperación [24,32] o de contaminación. Dada la ubicuidad del plomo en el medio ambiente, estos problemas no sólo se han descrito en la metodología de los *DBS* [24,33], sino también en tubos convencionales (*vacutainer*) para la recogida de sangre venosa [34].

La deseable eliminación de esa etapa implica realizar la determinación directamente sobre el *DBS* y para ello, en la actualidad, se dispone de herramientas mucho mejores que la antigua *copa de Delves*. En efecto, la determinación elemental sobre muestras sólidas mediante *GF-AAS* ya tiene una metodología bien establecida y ha demostrado su capacidad general para obtener buenos resultados en una gran variedad de muestras. Además, entre ellas, las que tienen una matriz orgánica tienden a ser las más sencillas de analizar [35-38].

El esquema del procedimiento que se pretende desarrollar en este apartado aparece sintetizado en la Figura III.1.2 e implica la realización de las siguientes etapas:

Figura III.1.2. Etapas en la determinación directa de plomo en sangre en un *DBS* mediante *GF-AAS*.



1) Se pincha el talón de un recién nacido (o un dedo de la mano en adultos) y se recoge la sangre en un capilar.

2) La sangre se deposita sobre dos de los tres círculos del papel de filtro y se deja secar.

3) Dado que el tamaño de cada *DBS* resulta excesivo para su introducción en la plataforma del horno de grafito, se procede al troquel de hasta siete discos de 3.2 mm de diámetro a partir de cada uno de los dos círculos con sangre y también del círculo sin impregnar, que se utilizará como blanco.

4) Las medidas (de la sangre y del blanco) se realizan colocando uno de los discos de 3.2 mm de diámetro en la plataforma del horno de grafito, añadiendo el modificante químico adecuado e introduciéndolo directamente en el horno de grafito donde se someterá al programa de atomización adecuado.

III.1.1. Condiciones de atomización del plomo en disolución acuosa.

Teniendo en cuenta la cantidad de sangre contenida en cada uno de los discos troquelados a partir de los *DBS*, que es aproximadamente 3 µL [16,39,40], y el rango de concentraciones esperadas para el Pb en sangre (desde menos de 10 hasta cientos de µg L^{-1}), el método que se desarrolle debe ser capaz de determinar desde unas decenas hasta cientos de picogramos de plomo.

Atendiendo al criterio de máxima sensibilidad se seleccionó la línea de 217.0 nm en lugar de la de 283.3 nm que es la más habitual para la determinación de plomo en muestras biológicas. Aunque esta última está menos sujeta a interferencias espectrales, su sensibilidad sólo alcanza un 40% de la de 217.0 nm [38,41].

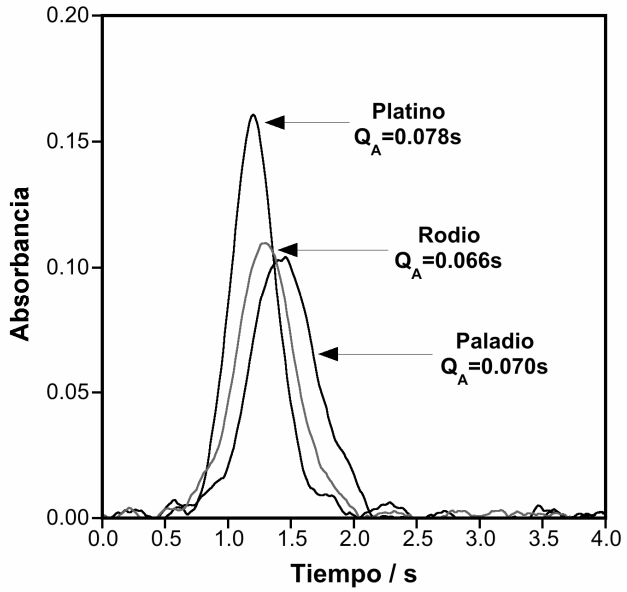
Por otra parte, es bien conocido que el plomo es un elemento bastante volátil en las condiciones de trabajo de *GF-AAS* y, por tanto, pueden producirse perdidas del analito durante la etapa de pirólisis. Puesto que se pretende utilizar una temperatura de pirólisis

suficientemente alta como para eliminar durante esta etapa la mayor parte de la matriz orgánica, es necesario usar un modificante químico que sea capaz de estabilizar el analito.

Aunque el fosfato ha sido un modificante químico muy utilizado en la determinación de plomo en muestras de sangre líquida diluida [42-45], hoy en día, los metales del grupo del platino están aceptados como los modificantes químicos más populares [46] y, de acuerdo con la literatura de determinaciones directas sobre muestras sólidas por *GF-AAS*, normalmente son los más eficaces [37,47,48]. Por lo tanto, se realizó un estudio comparativo de las prestaciones del paladio, platino y rodio como modificantes químicos para la atomización del plomo, en primer lugar desde disoluciones acuosas.

Como puede verse en la Figura III.1.3, los tres elementos son capaces de proporcionar para el plomo señales bien definidas, unimodales y de similar sensibilidad. El platino parece ligeramente mejor pues se obtiene un pico más agudo, lo que debe conducir a tiempos de integración menores (2.5 s son suficientes) y a una mejor relación señal/ruido. Además, la señal aparece un poco antes, lo que es preferible ya que ya que reduce el solapamiento con la señal de fondo en muestras reales, tal como se indicará más adelante.

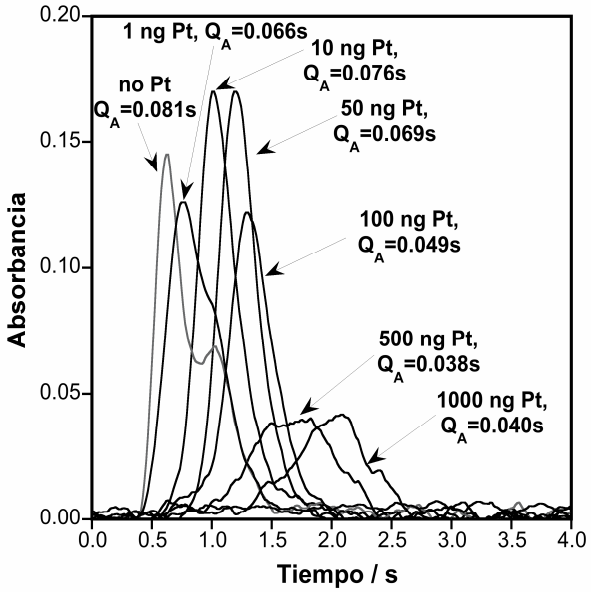
Figura III.1.3. Señales obtenidas en la atomización de 100 pg de plomo en disolución acuosa con varios modificantes químicos (10 ng de cada uno de ellos).



La cantidad de modificante debe ser adecuada para el rango esperado de concentraciones de plomo, pero debe evitarse el uso de cantidades muy elevadas ya que pueden conducir a fenómenos de sobre-estabilización, lo que produciría, por ejemplo, señales retardadas o con excesiva cola.

Se estudió el efecto de cantidades crecientes de platino (entre 0 y 1000 ng) en la medida de la absorción atómica de disoluciones de 100 pg de plomo, con los resultados que se presentan en la Figura III.1.4. De ella se deduce que la cantidad óptima de platino es de entre 10 y 50 ng, de forma que en los experimentos posteriores se utilizaron 50 ng (añadidos como 10 µL de una disolución de 5 mg de Pt L^{-1}).

Figura III.1.4. Señales obtenidas en la atomización de 100 pg de plomo en disolución acuosa con distintas cantidades de platino como modificante químico.



En estas condiciones, las curvas de pirolisis y atomización (que se presentarán en la Figura III.1.6, junto con las obtenidas a partir de los *DBS*) indican que el plomo en disolución acuosa puede ser estabilizado eficientemente durante la etapa de pirolisis hasta unos 1000 ºC.

Utilizando los valores de absorbancia integrada se calcula una masa característica de 5 pg, mejor que los valores disponibles en la literatura, que varían entre 9 y 40 pg. [42-44].

III.1.2. Condiciones de atomización del plomo en sangre.

Cuando se atomizó el plomo contenido en los *DBS* en las mismas condiciones utilizadas para disoluciones acuosas (colocación del disco en la plataforma y deposición sobre el mismo de 10 µL de una disolución de 5 mg de Pt L^{-1}), los resultados no fueron satisfactorios pues mostraron muy poca reproducibilidad.

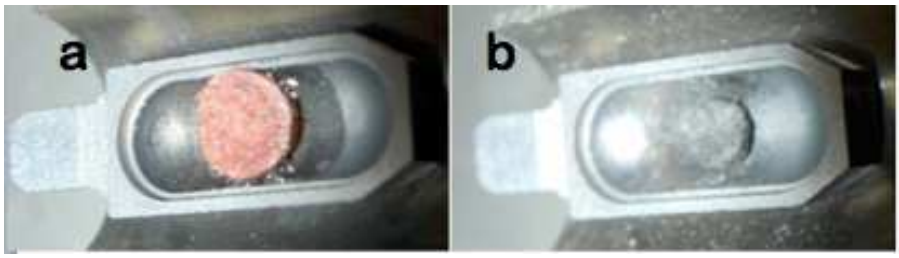
Esto se atribuyó a posibles modificaciones de la ubicación final del disco en la plataforma tras la adición de la disolución del modificante químico, existiendo incluso el riesgo potencial de que el disco se levante (sobre todo en el caso de discos sin sangre), lo que puede conducir a elevados valores de absorción inespecífica, posiblemente debido a la oclusión del haz de la lámpara [49]. Para resolver este problema se invirtió el orden de deposición en la plataforma: primero se pipetea la disolución del modificante químico y luego se coloca el disco sobre ella, presionando ligeramente, con lo que se logra un contacto íntimo entre ambos y se consigue que la posición del disco dentro de la plataforma pueda fijarse de una manera bastante reproducible.

Adicionalmente, la temperatura de la etapa de secado se aumentó a 200 ºC. Aunque cuando se trabaja con disoluciones acuosas 150 ºC resultaba una temperatura suficiente, al introducir los discos de sangre embebidos en la disolución de modificante químico, se oía un apreciable chisporroteo al comienzo de la etapa de pirólisis, lo que indicaba una insuficiente eliminación de dicha disolución durante la etapa previa de secado.

Con estas modificaciones el proceso de medida parece funcionar correctamente y el único problema remanente es la persistencia, tras el tratamiento de cada muestra, de un pequeño

residuo, muy compacto, de naturaleza carbonosa tal como se puede observar en la Figura III.1.5. Esto, que puede considerarse como típico de este tipo de muestra [44,49], no supone ninguna dificultad seria ya que ese residuo no está adherido a la plataforma y puede eliminarse fácilmente con un aguja.

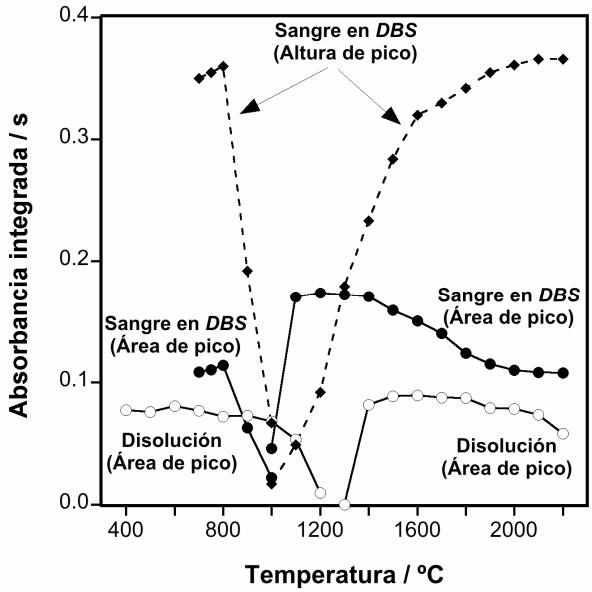
Figura III.1.5. Detalle de un disco de 3.2 mm de diámetro procedente de un *DBS*, antes (a) y después (b) de ser sometido al programa de temperaturas descrito en este trabajo.



El estudio en los discos procedentes de los *DBS* de los tres modificantes químicos utilizados para el plomo en disolución acuosa llevó a las mismas conclusiones: todos resultan adecuados, siendo el platino ligeramente mejor. Asimismo resultó idéntica la cantidad óptima de modificante químico a utilizar.

Sin embargo, las curvas de pirolisis (con una temperatura de atomización de 2000 ºC) y de atomización (con una temperatura de pirólisis de 800 ºC) del plomo en los discos de los *DBS* presentaron diferencias apreciables con respecto a las obtenidas en disolución acuosa, como puede apreciarse en la Figura III.1.6.

Figura III.1.6. Curvas de pirólisis y atomización para una disolución acuosa de plomo (100 pg) y para los *DBS* preparados a partir de una sangre de 86 µg L^{-1} (aproximadamente, 275 pg de plomo por disco).



La volatilidad del plomo en la sangre retenida en los discos es sensiblemente mayor que cuando se encuentra en disolución acuosa. Mientras en este caso se pueden alcanzar temperaturas de pirolisis de hasta 1000 ºC sin pérdidas apreciables de plomo, en el caso de los discos dichas pérdidas empiezan a producirse a partir de los 800 ºC.

Aunque como norma es deseable utilizar temperaturas de pirolisis más elevadas, en este caso concreto la pérdida no resulta problemática, ya que el uso de temperaturas de pirólisis en el rango 700-800 ºC parece ser suficiente para una vaporización eficaz de la mayoría de la matriz, como se deduce de la salida de gran cantidad de humo desde el horno al comienzo de esta etapa. Y, más importante, porque las señales obtenidas están perfectamente definidas.

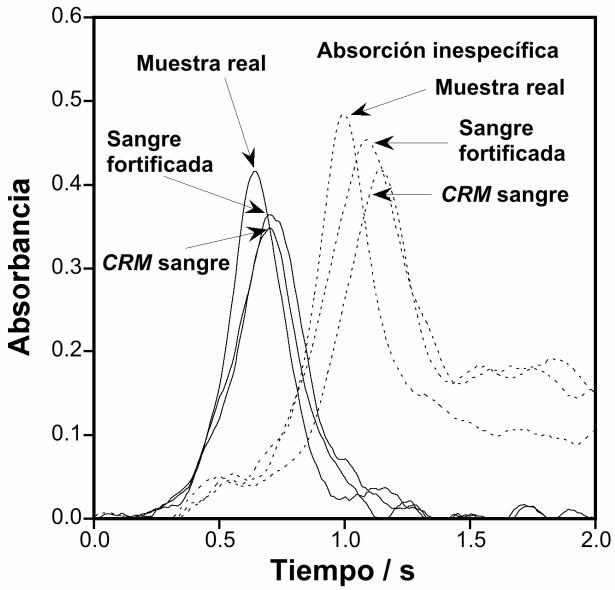
El uso de temperaturas de pirólisis inferiores a 700 ºC es claramente inadecuada, pues provoca valores de absorción inespecífica muy elevados y las señales del plomo son muy poco reproducibles. Por esta razón, en la Figura III.1.6 no aparecen representados valores de absorbancia por debajo de 700 ºC para el caso del plomo en sangre en los *DBS*.

El proceso de atomización del plomo desde la sangre retenida en los *DBS* también se produce a temperaturas inferiores (1100-1200 ºC) que cuando se trabaja con disoluciones acuosas (1500-1600 ºC). Sin embargo, las señales obtenidas a bajas temperaturas de atomización, a pesar de proporcionar un área mayor, presentan una cola excesiva como se deduce de la comparación de los valores de altura y área de pico que se muestran en la Figura III.1.6. Las señales están mejor definidas cuando la temperatura de atomización es superior a 1900 ºC, de forma que se eligió finalmente la temperatura de 2000 ºC para realizar las medidas.

Las condiciones de trabajo que se utilizaron finalmente se presentan en la Tabla II.2.

En la Figura III.1.7 se muestran ejemplos de señales típicas obtenidas desde discos de *DBS* impregnados de una muestra real, de un *CRM* (*ERM–CE194 bovine blood*) y de una sangre fortificada con una disolución de plomo (todas ellas con valores muy próximos a 130 µg de Pb L^{-1}). Como puede verse todas ellas son semejantes y aunque la absorción inespecífica es significativa, sólo se solapa ligeramente con la señal del plomo. La lámpara de deuterio debe ser suficiente para la adecuada corrección de este nivel de absorción inespecífica [50], lo que quedará demostrado por la calidad de los resultados que se obtuvieron y que se presentan en los siguientes apartados.

Figura III.1.7. Comparación de las señales obtenidas a partir de *DBS* impregnados con una muestra real, un *CRM* y una muestra sanguínea fortificada con una disolución de plomo antes de la deposición en el *DBS*.



Finalmente, si se comparan las Figuras III.1.4 y III.1.7, se puede observar que el plomo se atomiza más rápidamente desde la sangre impregnada en el papel de filtro que desde una

disolución acuosa. Mientras en este caso son necesarios dos segundos para completar el proceso, para los *DBS* es suficiente poco más de un segundo, siempre con 50 ng de platino como modificante químico.

En las condiciones de trabajo finalmente adoptadas, las señales obtenidas con diferentes discos obtenidos del mismo *DBS* presentan unos valores de DSR que oscilan entre un 12% y un 18%, lo que es típico de las determinaciones directas sobre muestras sólidas mediante *GF-AAS* [36] y da una indicación del grado de homogeneidad en la distribución del plomo dentro del *DBS* [51]. Por supuesto, la variación entre las medias o las medianas de varias réplicas es mucho menor, por lo que siguiendo la metodología establecida por este grupo para esta forma de trabajo se realizarán 5 réplicas por muestra [52].

III.1.3. Estudio de la deposición de sangre en papel de filtro.

La toma de muestra de sangre capilar sobre papel de filtro aparece recogida en el documento LA4-A5 del *NCCLS* (2007), *Blood collection on filter paper for neonatal screening programs; Approved Standard* [53] y se ha descrito en el Apartado II.3.3.

Una gota de sangre depositada sobre el papel de filtro, una vez seca, ocupa una superficie demasiado grande (un círculo de unos 11.5 mm de diámetro cuando se depositan 50 µL) para su introducción completa en el horno de grafito (la plataforma tiene una anchura de 3.3 mm) lo que puede apreciarse visualmente en la Figura III.1.5. Por lo tanto es necesario troquelar el *DBS* para obtener discos más pequeños que se puedan acomodar en la plataforma. Existen distintos troqueladores (*punchers*) disponibles comercialmente que proporcionan discos de 6.0, 4.7 o 3.2 mm de diámetro, de los cuales, sólo el último se ajusta a las dimensiones de la plataforma. Puesto que las gotas de sangre de muestras reales contienen una cantidad de sangre que suele exceder los 50 µL, resulta fácil troquelar al menos 7 discos de cada uno de los *DBS*, como se ve en la Figura III.1.2.

Como únicamente se va a analizar una porción de la muestra, es fundamental que la cantidad de plomo retenida por cm^2 de *DBS*, en cualquier lugar del mismo, dependa únicamente de la concentración en plomo de la sangre que se ha depositado. Para ello es necesario:

1) Que la cantidad de sangre retenida por cm^2 de papel sea constante, con independencia del volumen de sangre depositada y del nivel de hematocrito de la misma.

2) Que el contenido en plomo de la sangre en cada *DBS* sea homogéneo, es decir, que no se produzcan efectos cromatográficos en la distribución del plomo desde el centro de la gota hasta la periferia de la misma.

El cumplimiento de estos requisitos es un tema de debate en la literatura clínica [24,26,27] y, en su contribución al mismo, el trabajo desarrollado en esta Memoria tiene la ventaja de analizar directamente los discos, evitando así la posible influencia que cualquier procedimiento de digestión/extracción pueda tener en los resultados finales.

Estudio de la cantidad de sangre retenida

Para estudiar si la cantidad de sangre retenida por cm^2 de papel es independiente de factores como el volumen de sangre en el *DBS* o del nivel de hematocrito, se siguió el siguiente procedimiento:

1) Deposición en varios papeles de filtro de diferentes volúmenes de distintas sangres que varían en su contenido en plomo y en su hematocrito (determinados previamente por métodos convencionales).

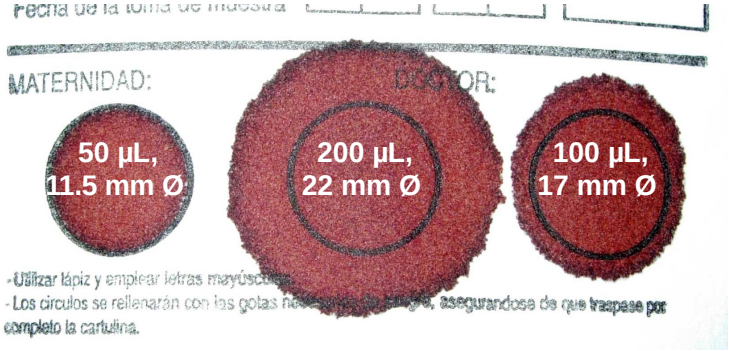
2) Troquelado de siete discos pequeños de cada *DBS*, todos ellos de la zona central del mismo. Asimismo se troquelan siete discos pequeños que no contienen sangre y que se utilizarán como blanco.

3) Pesada de todos los discos troquelados.

4) Medida directa de la absorción atómica del plomo en cada uno de estos discos tras la atomización en el horno de grafito.

Se seleccionaron cinco sangres de diferentes concentraciones de plomo (en el rango de 10 - 145 µg L^{-1}, que es el habitual para las sangres analizadas en la Unidad de Metales del Servicio de Bioquímica Clínica del Hospital Universitario Miguel Servet) y diferentes niveles de hematocrito (con variación entre el 29.7% y el 49.0%, que puede considerarse el rango fisiológico típico). La cantidad de sangre depositada en la preparación de cada *DBS* osciló entre 50 µL y 100 µL, que puede considerarse también como el rango máximo de variación en muestras reales. Realmente, 100 µL es un volumen elevado ya que excede claramente los límites señalados en las tarjetas clínicas de papel de filtro, como puede verse en la Figura III.1.8. Constituiría, en la práctica, la peor situación posible.

Figura III.1.8. *DBS* resultantes del pipeteo de diferentes volúmenes de sangre.



Tras troquelar siete discos de cada uno de los *DBS* y del blanco se pesaron los mismos en la microbalanza accesoria del espectrofotómetro obteniéndose los resultados que se presentan en la Tabla III.1.1.

Tabla III.1.1. Estudio de la cantidad de sangre contenida en cada disco troquelado.

	Volumen de sangre depositada en el papel de filtro			
muestra	**0 µL**	**50 µL**	**75 µL**	**100 µL**
	peso (mg)			
sangre 1 (10 µg Pb L^{-1})	1.502 ± 0.053	2.377 ± 0.060	2.320 ± 0.091	2.487 ± 0.123
sangre 2 (32 µg Pb L^{-1})	1.512 ± 0.053	2.387 ± 0.143	2.328 ± 0.061	2.300 ± 0.115
sangre 3 (70 µg Pb L^{-1})	1.494 ± 0.085	2.374 ± 0.120	2.369 ± 0.073	2.426 ± 0.108
sangre 4 (107 µg Pb L^{-1})	1.506 ± 0.076	2.359 ± 0.097	2.332 ± 0.065	2.312 ± 0.097
sangre 5 (145 µg Pb L^{-1})	1.522 ± 0.075	2.411 ± 0.121	2.306 ± 0.092	2.327 ± 0.130

Cada resultado corresponde a la media de siete réplicas.
La incertidumbre se expresa como desviación estándar.

Para los blancos, los valores de DSR pueden considerarse satisfactorios, tanto para las siete réplicas de cada *DBS*, con valores en el rango del 3-5%, como entre los diferentes *DBS* (DSR del 3.7%, para n = 5). Estos resultados confirman tanto la reproducibilidad del instrumento utilizado para troquelar los *DBS*, como la calidad del papel de filtro estándar utilizado.

La cantidad de sangre seca retenida en cada disco (que es próxima a 0.85 mg) muestra un grado similar de reproducibilidad. Los valores de DSR para el peso de los discos de sangre seca procedentes del mismo *DBS* variaron entre el 2.5% y el 5% en la mayoría de los casos. La realización de un análisis de varianza demostró que no existen diferencias significativas en la cantidad de sangre retenida, tanto entre las diferentes sangres (F_{valor} = 1.68, $F_{crítico}$ = 2.47), como entre los diferentes volúmenes de sangre depositada (F_{valor} = 2.36, $F_{crítico}$ = 3.10).

Por lo tanto, el procedimiento evaluado parece cumplir el requisito de que la cantidad de sangre retenida por cm^2 de papel sea constante, ya que la posible influencia de diferentes niveles de hematocrito (dentro del rango fisiológico habitual del 30-50%) o del volumen de sangre depositada sobre el papel de filtro no resulta estadísticamente significativa. Esto último es sumamente importante ya que, cuando se aplique el método a muestras reales, el volumen exacto de la sangre en el *DBS* será desconocido.

Estos resultados coinciden con algunos previamente publicados [26,54], aunque también hay autores que indican lo contrario [24,27]. Como una confirmación adicional, todos estos discos previamente pesados fueron analizados por *GF-AAS*, de forma que también se pudo evaluar la reproducibilidad de la cantidad de plomo retenida en cada disco troquelado, parámetro que resulta definitivo para valorar la aplicabilidad del método.

La tabla III.1.2 muestra los valores de absorbancia integrada del plomo obtenidos directamente por medio de *GF-AAS* para cada uno de los discos. Cada valor tabulado corresponde a la media de siete réplicas, tras sustraer previamente la absorbancia media de los blancos, de forma que pueda apreciarse más claramente el grado de linealidad alcanzado.

Tabla III.1.2. Estudio de la reproducibilidad de la cantidad de plomo contenida en cada disco troquelado.

	Volumen de sangre depositada en el papel de filtro			
muestra ([Pb])	**0 µL**	**50 µL**	**75 µL**	**100 µL**
		absorbancia integrada (s^{-1})		
sangre 1 (10 µg Pb L^{-1})		0.013 ± 0.007	0.011 ± 0.006	0.009 ± 0.002
sangre 2 (32 µg Pb L^{-1})		0.032 ± 0.004	0.029 ± 0.010	0.029 ± 0.010
sangre 3 (70 µg Pb L^{-1})		0.080 ± 0.021	0.071 ± 0.022	0.083 ± 0.013
sangre 4 (107 µg Pb L^{-1})		0.095 ± 0.015	0.107 ± 0.022	0.109 ± 0.008
sangre 5 (145 µg Pb L^{-1})		0.148 ± 0.020	0.143 ± 0.020	0.146 ± 0.019

Cada resultado corresponde a la media de siete réplicas.
La incertidumbre se expresa como desviación estándar.

De nuevo, los valores obtenidos sugieren que la variación del volumen de sangre depositada en el papel de filtro y el proceso de troquelado no introducen ningún sesgo. El análisis de varianza demuestra claramente esta hipótesis, ya que no hay diferencias significativas de la absorción atómica del plomo entre los diferentes volúmenes de sangre depositados (F_{valor} = 0.05, $F_{crítico}$ = 2.47). Además, la relación entre la absorbancia y la concentración de plomo es lineal, de forma que con los tres volúmenes de sangre utilizados se obtuvieron unos coeficientes de correlación de Pearson de 0.99 o mayores.

De este estudio puede concluirse que la cantidad de sangre retenida por cm^2 del papel de filtro es esencialmente constante y la cantidad de plomo contenida en cada disco depende (linealmente) sólo de la concentración de plomo en las muestras de sangre, lo que representa la situación analítica más favorable.

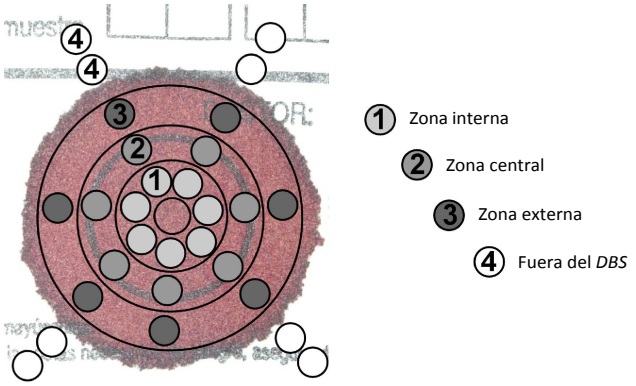
Estudio de la homogeneidad de la distribución del plomo

De los buenos resultados descritos en la sección anterior se podría deducir que la distribución del plomo en el *DBS* es homogénea. Tal deducción sería incorrecta pues todos los discos pequeños se troquelaron de la zona central del círculo impregnado de sangre. En consecuencia, estos estudios no garantizan que el contenido en plomo no difiera desde el centro del círculo de sangre a los extremos, lo que sucedería si el papel ejerciera un efecto cromatográfico que, en un caso extremo, podría llevar al plomo más allá de los límites marcados por la sangre. Si se produjera esta situación, la determinación de plomo por el método estudiado resultaría inviable.

Sobre este tema la literatura proporciona, de nuevo, resultados relativamente contradictorios. El-Hajjar *et al*. [54] indicaron que no se observaban diferencias significativas en la concentración de plomo entre las diversas zonas de la gota de sangre seca, siempre que se excluyera de la comparación el borde de la misma. La posible influencia de este borde es de escasa relevancia práctica para el procedimiento investigado en este trabajo, ya que difícilmente será incluido en un disco troquelado, pues se correría claramente el riesgo de incluir en el mismo alguna porción del papel sin sangre. Por otra parte, Mei *et al*. [40] afirmaron que los discos obtenidos de la zona más interior contenían un volumen de sangre mayor que los exteriores, aunque las diferencias suponían menos del 2%, un valor demasiado pequeño como para afectar la aplicabilidad del método. En ese trabajo no se realizó una evaluación de la incidencia de este parámetro en la distribución del plomo, ya que no estaba dedicado a este analito en particular.

Con el fin de tener nuestras propias conclusiones se realizó un estudio específico del tema. Para ello, se depositaron dos gotas de la misma sangre sobre dos papeles de filtro pipeteando 200 µL de la misma en cada uno de ellos. Con este volumen la superficie de papel impregnado por la sangre rebasa ampliamente los límites señalados en la tarjeta clínica, como puede observarse en la Figura III.1.9.

Figura III.1.9. Zonas en las que se dividió cada *DBS* para el estudio de la homogeneidad de la distribución del plomo.



En estas condiciones, el *DBS* se puede dividir en tres zonas diferentes como se indica en dicha figura: interna (que es la única que se había utilizado en los estudios anteriores), central y externa. De cada una de ellas se troquelaron siete discos pequeños en dos *DBS* de la misma sangre para obtener un total de catorce discos por zona. Además, se troquelaron discos blancos de zonas externas a la gota de sangre seca para descartar la migración del plomo fuera del área delimitada por la sangre.

Los resultados obtenidos tras la medida directa de la absorción atómica del plomo en los distintos discos por *GF-AAS* (catorce medidas para cada zona) se presentan en la Tabla III.1.3.

Tabla III.1.3. Resultados del estudio de la homogeneidad de la distribución del plomo.

	absorbancia integrada (s^{-1})		
muestra	**zona interna**	**zona central**	**zona externa**
CRM ERM–CE194	0.116 ± 0.021	0.114 ± 0.014	0.116 ± 0.011

Cada resultado corresponde a la media de catorce réplicas.
La incertidumbre se expresa como desviación estándar.

No parece que haya diferencias entre la absorción atómica del plomo en las distintas zonas, lo que indicaría una distribución homogénea. El análisis de varianza confirma esta impresión ya que las posibles diferencias están muy lejos de ser estadísticamente significativas (F_{valor} = 0.13, $F_{crítico}$ = 3.23).

En cuanto a los discos troquelados fuera de la zona delimitada por la sangre (zona 4 de la Figura III.1.9), estos no produjeron señal apreciable para el plomo pues las señales generadas son similares a las obtenidas cuando se introduce en la cámara de grafito únicamente disolución de modificante químico, lo que indica que no se produce migración de plomo fuera de la zona delimitada por la sangre.

En conclusión, estos resultados indican que el papel no ejerce ningún efecto cromatográfico en la distribución del plomo y, en consecuencia, los discos que se introduzcan en el horno de grafito para realizar la determinación del plomo se pueden obtener de cualquier zona del *DBS* que se encuentre completamente impregnada de sangre.

III.1.4. Calibrado.

Uno de los principales inconvenientes para realizar determinaciones directas a partir de muestras sólidas es la dificultad para realizar el calibrado que, en la mayoría de los casos, requiere disponer de patrones sólidos. Con mucha frecuencia no es posible obtener materiales bastante homogéneos y con una matriz suficientemente similar a las muestras a estudiar.

Las determinaciones elementales directas sobre muestras sólidas mediante *GF-AAS* constituyen una excepción pues, aunque en un principio se comenzó calibrando con patrones sólidos [55,56], los trabajos realizados en los últimos años han demostrado que, en la mayoría de los casos, se pueden obtener buenos resultados realizando el calibrado mediante disoluciones de estándares acuosos [36,37]. De hecho, esta es la forma de trabajo más habitual en la actualidad.

Sin embargo, la situación que plantea este trabajo resulta un tanto especial ya que, en origen, la muestra es líquida (y además, en la práctica para muestras reales, de volumen desconocido) transformándose en una muestra sólida al depositarla sobre el papel de filtro. Algunas características del método hacen que, *a priori*, el calibrado con patrones disueltos no resulte muy prometedor.

En primer lugar, no es sencillo establecer la relación entre la cantidad absoluta de plomo presente en un disco de 3.2 mm de diámetro y la concentración de plomo en la muestra original de sangre, puesto que para este cálculo sería necesario conocer el volumen exacto de sangre líquida que se depositó sobre dicho disco. Es posible realizar una estimación del mismo depositando un volumen conocido de sangre sobre la tarjeta clínica, midiendo el diámetro del

DBS resultante y relacionando su área (asumiendo que el *DBS* es perfectamente circular) con el área del disco obtenido a partir del troquel del *DBS*.

Mediante este procedimiento, se calculó que en cada disco de 3.2 mm de diámetro hay depositados 3 µL de sangre fresca, lo que está de acuerdo con los valores obtenidos por otros investigadores [16,39,40]. Sin embargo, esto no deja de ser una estimación un tanto grosera no muy adecuada para cuantificación.

Además, los resultados obtenidos en el Apartado III.1.2 parecen indicar que las señales obtenidas para cantidades similares de plomo atomizadas desde un *DBS* y desde disoluciones acuosas son diferentes. En este último caso la absorbancia parece mayor (ver la Figura III.1.6) lo que indicaría que la absorción atómica del plomo en los *DBS* no está libre de efectos de matriz. Se ha descrito una situación similar en la determinación de plomo en sangre líquida cuando la muestra no está suficientemente diluida [44].

Para asegurar este comportamiento se pipeteó en el papel de filtro un volumen muy pequeño (1 µL) de sangre de concentración conocida de forma que, en estas condiciones, un disco de 3.2 mm de diámetro contiene la totalidad de la sangre depositada. En consecuencia, la cantidad de plomo introducida en el horno de grafito era perfectamente conocida. La señal de absorción atómica obtenida a partir de estos discos era aproximadamente la mitad de la producida por una cantidad similar de plomo atomizado desde una disolución acuosa.

Aunque esta última dificultad puede considerarse un problema frecuente cuando se realizan determinaciones directas sobre muestras sólidas calibrando con patrones disueltos y puede intentar resolverse mediante nuevas optimizaciones del programa de atomización y ensayando diferentes modificantes químicos [47], las circunstancias acumuladas en este procedimiento parecen aconsejar una aproximación diferente.

En concreto, se decidió utilizar patrones con matriz semejante al problema (patrones emparejados o *matrix-matched standards*), es decir, sangres de concentración conocida que se depositan en un papel de filtro y se someten al mismo proceso que las muestras. Este procedimiento presenta las siguientes ventajas importantes:

1) Los efectos de matriz detectados no deberían introducir sesgo en los resultados ya que afectan tanto a los patrones como a las muestras.

2) No es necesario realizar ningún tratamiento ulterior de los resultados ya que la concentración de plomo en la sangre se obtiene directamente por interpolación en la curva de calibrado.

3) Resulta sencillo para un laboratorio clínico la preparación de patrones homogéneos de la concentración requerida a partir de muestras de sangre reales, prácticamente exentas de plomo (por debajo de su límite de detección mediante *GF-AAS* convencional), fortificándolas con disoluciones de este elemento. Alternativamente pueden utilizarse *CRMs* de matriz sanguínea.

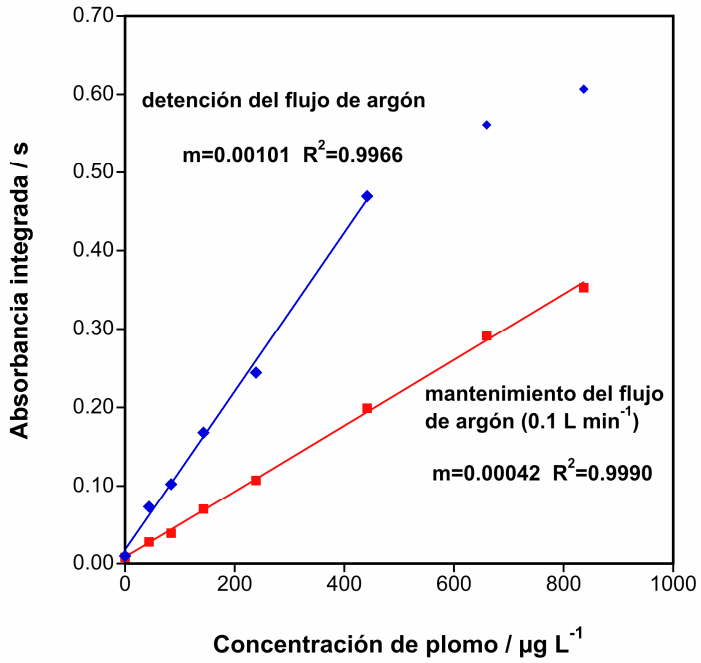
Para realizar el calibrado y estudiar el rango lineal alcanzable por este procedimiento, se prepararon varios patrones con un rango de concentraciones de plomo desde 44 hasta 837 µg L^{-1} a partir de sangres reales exentas de plomo con adición de cantidades muy pequeñas (entre 3 y 18 µL por mL de sangre) de disolución en suero fisiológico de este elemento. No se ensayaron concentraciones mayores ya que no se presentan hoy en día en seres humanos y, en caso de aparecer, requerirían un tratamiento médico urgente sin necesidad de conocer el contenido exacto de plomo en la sangre.

Cada patrón se depositó en un papel de filtro que tras su secado se troqueló como se ha indicado anteriormente; para cada punto de calibrado se introdujeron sucesivamente en el atomizador 3 discos troquelados. Realizando las medidas con detención del flujo de argón en la etapa de atomización (*stop flow conditions*), que es la forma de trabajo habitual en *GF-AAS*, el método mostró buena linealidad ($r^2 \geq 0.995$) hasta 450 µg L^{-1}, que es suficiente para la mayoría de las determinaciones de la concentración de plomo en sangre humana.

Si se desea extender este rango la forma más sencilla de hacerlo, frecuente en las determinaciones directas sobre muestras sólidas mediante *GF-AAS*, es mantener el flujo de argón durante la etapa de atomización (*non stop-flow conditions*). Por ejemplo, si se mantiene el flujo mínimo que permite el instrumento (0.1 L de Ar min^{-1}), el calibrado es lineal, al menos, hasta 837 µg L^{-1} ($r^2 \geq 0.999$), aunque a costa de rebajar la sensibilidad a un tercio de la que se tiene trabajando con detención de flujo. La Figura III.1.10 muestra curvas de calibrado típicas en ambas condiciones de trabajo.

Finalmente, para confirmar la robustez del método de calibrado propuesto, se prepararon tres conjuntos de diferentes sangres fortificadas con disoluciones de plomo como se ha indicado anteriormente y, durante varios días, se sometieron al proceso descrito realizando las medidas con detención del flujo de argón. En todos los casos se obtuvieron pendientes muy semejantes con valores extremos de 0.00092 y 0.00101 s L $µg^{-1}$.

Figura III.1.10. Curvas de calibrado para el plomo en sangre retenida en un *DBS*.



III.1.5. Resultados de la determinación de plomo en sangre.

Con los estudios anteriores se fijaron los procedimientos operativos descritos en los Apartados II.3.3 (para la toma y tratamiento de las muestras) y II.5.2 (para realizar las determinaciones) con los que se procedió a la determinación de plomo en varias muestras de sangre.

En primer lugar, y como mejor prueba de la validez del método, se analizó un *CRM* (*ERM-CE194 bovine blood*), muestra que se seleccionó porque su contenido en Pb (126 ± 4 µg L^{-1}) es

cercano al *nivel de preocupación* (100 µg L^{-1}) establecido por el *Centers for Disease Control and Prevention* hasta el año 2012 [57].

Se realizaron trece determinaciones independientes, el resultado de cada una de las cuales es la mediana de cinco réplicas (cinco discos troquelados del mismo *DBS*). En esta fase final del trabajo se prefirió el uso de la mediana al de la media porque estudios anteriores han probado que es más eficaz ante la posible aparición de resultados anómalos en las determinaciones directas sobre muestras sólidas [52]. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla III.1.4.

Tabla III.1.4. Resultados obtenidos en la determinación de plomo en un material de referencia.

Muestra		Método propuesto	Valor certificado
CRM ERM-CE194	Número de determinaciones	13	
	Concentración de Pb (µg L^{-1})	131 ± 5	126 ± 4
	DSR %	6.2	

La incertidumbre está expresada como intervalo de confianza al 95%.

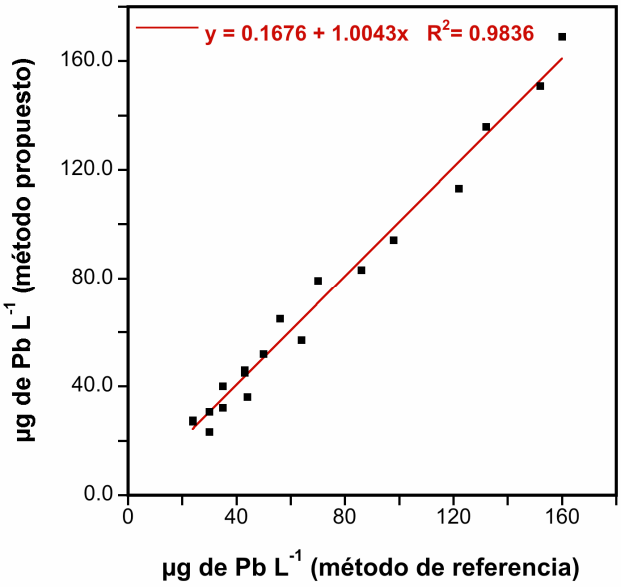
Estos valores confirman que se pueden obtener resultados suficientemente correctos mediante este procedimiento, pues el valor medio es muy próximo al certificado y la imprecisión (DSR del 6.2%) resulta adecuada a la finalidad propuesta. Como referencia, merece la pena mencionar que el criterio del *Clinical Laboratory Improvement Amendments* para este rango de concentración considera una desviación de hasta 40 µg L^{-1} como aceptable. La metodología propuesta parece capaz de cumplir los requisitos más rigurosos.

El valor de DSR obtenido puede considerarse anormalmente bajo para una determinación directa sobre muestras sólidas mediante *GF-AAS*, pero debe tenerse presente que en este caso la muestra original era líquida y, presumiblemente, la distribución del analito sobre el *DBS* sea mucho más homogénea que en un sólido original, cuya inhomogeneidad se considera la principal causa de imprecisión en estas determinaciones [51].

Para confirmar definitivamente la aplicabilidad del método, se analizaron muestras reales. Se obtuvo sangre de varios pacientes, tanto por venopunción como por pinchazo en el dedo o talón y deposición de la gota de sangre en papel de filtro, de forma que se evaluó de forma completa la metodología propuesta y se compararon sus resultados con el método de referencia descrito en el Apartado II.5.1.

En este estudio se trató de cubrir el rango más amplio posible de concentraciones de plomo pero teniendo en cuenta que, afortunadamente, la contaminación por plomo no es habitual en nuestro entorno, sólo fue posible seleccionar sangres que cubrían el rango desde por debajo del límite de cuantificación hasta 160 µg de Pb L^{-1}. Como la mayoría de las muestras presentaban valores inferiores a 30 µg L^{-1}, se seleccionaron finalmente 18 muestras cuyas concentraciones se distribuían más o menos regularmente a lo largo del rango desde 24 hasta 160 µg de Pb L^{-1}, puesto que valores muy extremos podrían sesgar el estudio hacia una mejor correlación. Los resultados de esta comparación de ambos métodos están representados en la Figura III.1.11.

Figura III.1.11. Comparación de los resultados obtenidos en la determinación de plomo en varias muestras de sangre por el método propuesto y el de referencia.



El buen ajuste que pone de manifiesto el coeficiente de correlación de Pearson, el bajo valor de la ordenada en el origen y la cercanía de la pendiente a la unidad, demuestran que se consigue un alto grado de concordancia entre ambas metodologías.

Sin embargo, en la comunidad clínica, el modo más aceptado de comparar el grado de acuerdo entre dos métodos diferentes es el procedimiento de regresión lineal no paramétrico denominado análisis de regresión de Passing-Bablok [58] que, como todas las aproximaciones no-paramétricas, es menos sensible a valores anómalos. Además, en lugar de usar el coeficiente de correlación de Pearson, se recomienda el uso del coeficiente de Lin, que proporciona una estimación más robusta del grado de concordancia entre dos métodos midiendo la desviación de los resultados respecto de la esperada línea de 45º desde el origen [59].

Por lo tanto, el mismo conjunto de resultados se analizó también por el método de Passing-Bablok. La regresión obtenida fue: método propuesto = −4.333 + 1.017 x método de referencia. Los intervalos de confianza del 95% para la pendiente (0.93 hasta 1.18) y para la ordenada en el origen (−18.39 hasta 2.95) incluyen los valores 1 y 0, respectivamente, probando que no hay evidencia de ninguna diferencia sistemática, constante o proporcional, entre ambos métodos. El coeficiente de concordancia de Lin fue de 0.98 lo que confirma la aseveración anterior.

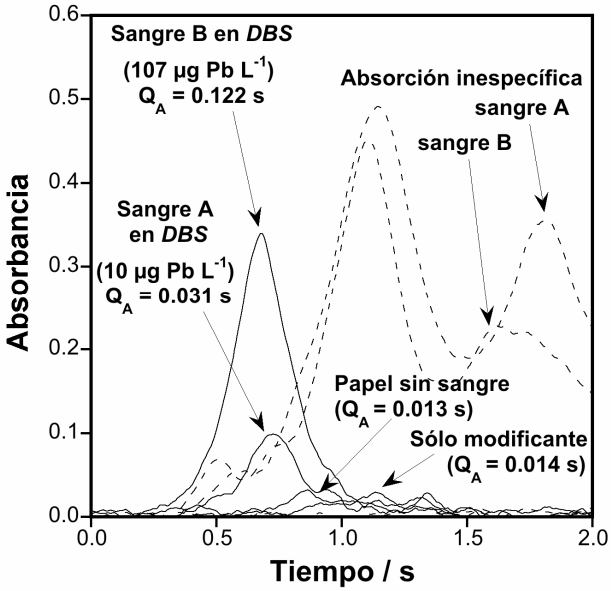
A la vista de estos resultados (que quedarán reforzados en el Apartado III.2 de esta Memoria con un número mucho mayor de muestras) convendría revisar trabajos previos en los que la comparación de las determinaciones de plomo por el método de referencia y tras ser depositadas sobre un papel de filtro mostraban claras discordancias. En la mayoría de los casos, por este último procedimiento se obtenían resultados significativamente más bajos, con pendientes en la correlación entre 0.8 y 0.9 [25,27,60]. Estos resultados, junto con los obtenidos en este trabajo, pueden sugerir una incompleta recuperación del plomo desde el *DBS* durante el proceso de extracción. En efecto, la introducción directa del *DBS* en el horno de grafito elimina cualquier problema inherente a la recuperación del analito y puede considerarse una ventaja significativa del método desarrollado.

Otro tema de controversia en la literatura clínica referida a la determinación de plomo en sangre tras deposición de la misma en un papel de filtro es su tendencia a proporcionar resultados anormalmente elevados. Este hecho se atribuye a menudo a la contaminación de la muestra durante su recolección debido al plomo presente en la superficie de la piel [24,61] y, por supuesto, un adecuado lavado previo de la zona de extracción debería solucionar este problema, como se ha demostrado en varios trabajos [9,60]. Sin embargo, también se ha mencionado como la razón de que se produzca un sesgo positivo la posible contaminación del papel con plomo [24,54], aunque los resultados de otros trabajos están en desacuerdo [26,27].

Puesto que en estos trabajos es necesaria la digestión de la muestra o la extracción del analito, puede ser difícil discriminar entre el nivel de contaminación del papel de filtro y el de los diferentes reactivos utilizados, lo que puede ser la causa de estas discrepancias. La aportación al tema de este trabajo es que, durante el desarrollo del mismo se trataron más de 100 tarjetas de papel de filtro exentas de sangre (blancos) sin que en ninguna de ellas se detectaran trazas de plomo, lo que refuerza la opinión de que el papel utilizado puede considerarse exento de este elemento.

La Figura III.1.12 muestra el perfil típico obtenido para un blanco (un disco de papel de filtro sin sangre junto con 10 µL de disolución de modificante químico). Como puede verse, no es significativamente diferente de la señal obtenida al atomizar únicamente disolución de modificante y no da indicación de que se produzca ninguna absorción atómica de plomo. Por otra parte, también se observa que la señal de una muestra de sangre de 10 µg Pb L^{-1} puede diferenciarse con claridad de la de un blanco.

Figura III.1.12. Comparación de las señales en blanco y del plomo en dos *DBS*.



Finalmente, se calculó el límite de detección del método desarrollado, que resultó ser de 2.5 µg de Pb L^{-1}. Este valor es inferior a los obtenidos en otros trabajos que utilizan el método estándar (análisis por *GF-AAS* de la muestra venosa diluida) y que ofrecen valores que oscilan entre 4 µg L^{-1} y 13 µg L^{-1} [16,42,44,49,50,62]. En todo caso se adecua perfectamente al propósito del método, ya que los valores de plomo para este nivel de concentración apenas son relevantes desde un punto de vista toxicológico.

III.1.6. Conclusiones.

Se ha desarrollado un procedimiento rápido y relativamente sencillo que permite la determinación directa de plomo en los *DBS* mediante *GF-AAS*, utilizando unas condiciones de trabajo (programa de temperaturas, uso de platino como modificante químico) que pueden considerarse completamente convencionales y minimizando el riesgo de contaminación.

Los resultados para cada *DBS* se obtienen como la mediana de los valores obtenidos en cinco pequeños discos troquelados del mismo y muestran buena concordancia con los obtenidos por venopunción y análisis convencional de la muestra líquida diluida. Su sensibilidad permite la determinación de plomo a niveles de unos pocos µg Pb L^{-1}, con unos valores de DSR en torno al 6%, parámetros ambos que son más que suficientes para la práctica clínica habitual de estas determinaciones.

La técnica de *GF-AAS* convencional, pese a su carácter monoelemental y su aparente modestia frente a otras más sofisticadas, parece perfectamente adecuada para realizar la determinación de plomo en sangre, que es la determinación elemental más frecuente en el ámbito del análisis clínico.

Ni la cantidad de sangre depositada para formar el *DBS* ni el nivel de hematocrito, siempre en el supuesto de que ambos parámetros se mantienen dentro de términos amplios pero razonables, parecen tener ninguna influencia en los resultados obtenidos. Asimismo, dentro del nivel de discriminación espacial que permite la técnica utilizada (discos de 3.2 mm de diámetro), no se observan efectos cromatográficos y la distribución del plomo en el *DBS* parece uniforme, siempre que se evite, evidentemente, incluir en el disco el borde de la mancha.

Como aspecto menos positivo del método desarrollado, no se ha conseguido realizar el calibrado frente a patrones acuosos, siendo necesario recurrir al procedimiento de patrones emparejados.

Dado que el procedimiento desarrollado proporciona resultados rápidos y fiables, parece factible realizar su adaptación como etapa de criba en un procedimiento de *screening*, lo que se estudiará en el apartado siguiente.

III.1.7. Bibliografía

[1] C.D. Toscano, T.R. Guilarte. Lead neurotoxicity: from exposure to molecular effects. *Brain Res. Rev.*, 2005, 49, 529–554.

[2] President's Task Force on Environmental Health Risks and Safety Risks to Children. Eliminating Childhood Lead Poisoning: A Federal Strategy Targeting Lead Paint Hazards. February 2000. http://www.cdc.gov/nceh/lead/about/fedstrategy2000.pdf (last accessed 28-03-2014).

[3] H.A. Godwin. The biological chemistry of lead. *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 2001, 5, 223–227.

[4] L. Calvo Ruata. Comunicación Personal.

[5] T.I. Lidsky, J.S. Schneider. Lead neurotoxicity in children: basic mechanisms and clinical correlates. *Brain*, 2003, 126, 5–19.

[6] R.L. Canfield, C.R. Henderson Jr., D.A. Cory-Slechta, C. Cox, T.A. Jusko, B.P. Lanphear. Intellectual impairment in children with blood lead concentrations below 10 µg per deciliter. *N. Engl. J. Med.*, 2003, 348, 1517–1526.

[7] American Academy of Pediatrics, Committee on Environmental Health. Lead exposure in children: prevention, detection, and management. *Pediatrics*, 2005, 116, 1036–1046.

[8] M. Mazumdar, D.C. Bellinger, M. Gregas, K. Abanilla, J. Bacic, H.L. Needleman. Low-level environmental lead

exposure in childhood and adult intellectual function: a follow-up study. *Environ. Health*, 2011, 10, 24.

[9] X.-M. Shen, Y.-W. Zhang, S.-H. Wu, C.-H. Yan, J.-M. Ying, R.-Q. Li. Applicability of a filter paper method to measure blood lead levels in large populations of Chinese children. *Clin. Chim. Acta*, 2003, 328 99–104.

[10] G.A. Mostafa, H.H. El-Shahawi, A. Mokhtar. Blood lead levels in Egyptian children from high and low lead-polluted areas: impact on cognitive function. *Acta Neurol. Scand.*, 2009, 120, 30–37.

[11] A. Roy, D. Bellinger, H. Hu, J. Schwartz, A. Ettinger, R. Wright, M. Bouchard, K. Palaniappan, K. Balakrishnan. Lead Exposure and Behavior among Young Children in Chennai, India. *Environ Health Perspect.*, 2009, 117, 1607–1611.

[12] G. Falq, A. Zeghnoun, M. Pascal, M. Vernay, Y. Le Strat, R. Garnier, D. Olichon, P. Bretin, K. Castetbon, N. Fréry. Blood lead levels in the adult population living in France the French Nutrition and Health Survey (ENNS 2006–2007). *Environ. Int.*, 2011, 37, 565–571.

[13] H.T. Delves. A micro-sampling method for rapid determination of lead in blood by atomic-absorption spectrophotometry. *Analyst*, 1970, 95, 431–438.

[14] A.A. Cernik, M.H. Sayers. Determination of lead in capillary blood using a paper punched disc atomic absorption technique. Application to the supervision of lead workers. *Br. J. Ind. Med.*, 1971, 28, 392–398.

[15] K. Verebey, Y.M. Eng, B. Davidow, A. Ramon. Rapid, sensitive micro blood lead analysis: a mass screening technique for lead poisoning. *J. Anal. Toxicol.*, 1991, 15, 237–240.

[16] S.T. Wang, H.P. Demshar. Determination of blood lead in dried blood-spot specimens by Zeeman-efect background corrected atomic-absorption spectrometry. *Analyst*, 1992, 117, 959–961.

[17] H.Y. Yee, K. Srivuthana, R. Elton, K. Bhambhani, R.E. Kauffman. Capillary blood collection by paper for lead analysis by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Microchem. J.*, 1995, 52, 370–375.

[18] H.Y. Yee, T.G. Holtrop. An improved capillary blood-filter paper-graphite furnace atomic absorption spectrometric method for lead screening. *J. Anal. Toxicol.*, 1997, 21, 142–148.

[19] K. Verebey, J.F. Rosen, D.J. Schonfeld, D. Carriero, Y.M. Eng, J. Deutsch, S. Reimer, J. Hogan. Blood collection and analytical considerations in blood lead screening in children. *Clin. Chem.*, 1995, 41, 469–470.

[20] H.T. Delves. Blood collection for screening children for exposure to lead. *Clin. Chem.*, 1996, 42, 983–984.

[21] K. Verebey. Blood collection for screening children for exposure to lead - Respond. *Clin. Chem.*, 1996, 42, 984–985.

[22] H.T. Delves. Blood lead screening (continued). *Clin. Chem.*, 1997, 43, 1246–1247.

[23] K. Verebey. Blood lead screening (continued) - Response. *Clin. Chem.*, 1997, 43, 1247–1248.

[24] T.P. Moyer, D.N. Nixon, K.O. Ash. Filter paper lead testing. *Clin. Chem.*, 1999, 45, 2055–2056.

[25] N.V. Stanton, J.M. Maney, R. Jones. Evaluation of filter paper blood lead methods: results of a pilot proficiency testing program. *Clin. Chem.*, 1999, 45, 2229–2235.

[26] K. Verebey. Filter paper-collected blood lead testing in children. *Clin. Chem.*, 2000, 46, 1024–1026.

[27] T.P. Moyer, D. Nixon, O.K. Ash. Filter paper-collected blood lead testing in children - Response. *Clin. Chem.*, 2000, 46, 1026–1028.

[28] N. Stanton, J. Maney, R. Jones. More on filter paper lead testing. *Clin. Chem.*, 2000, 46, 1028–1029.

[29] Y.W. Wong, E.R. Ashwood, W. Gordon, K.O. Ash. ICP-MS quantitation of lead in blood collected in paper. *Clin. Chem.*, 1995, 41, S145.

[30] S.N. Chaudhuri, S.J.M. Butala, R.W. Ball, C.T. Braniff. Pilot study for utilization of dried blood spots for screening of lead, mercury and cadmium in newborns. *J. Expos. Sci. Environ. Epidemiol.*, 2009, 19, 298–316.

[31] E.K. Langer, K.J. Johnson, M.M. Shafer, P. Gorski, J. Overdier, J. Musselman, J.A. Ross. Characterization of the elemental composition of newborn blood spots using sector-field inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J. Expos. Sci. Environ. Epidemiol.*, 2011, 21, 355–364.

[32] M.T. Di Martino, A. Michniewicz, M. Martucci, G. Parlato. EDTA is essential to recover lead from dried blood spots on filter paper. *Clin. Chim. Acta*, 2004, 350, 143–150.

[33] D.J. Schonfeld, M.R. Cullen, P.M. Rainey, A.T. Berg, D.R. Brown, J.C. Hogan, D.S. Turk, C.S. Rude, D.V. Cicchetti. Screening for lead-poisoning in an urban pediatric-clinic using samples obtained by fingerstick.

Pediatrics, 1994, 94, 174–179.

[34] J. Crick, A.R. Flegal. Contaminant lead in blood-collection tubes for trace-element studies. *Clin. Chem.*, 1992, 38, 600–601.

[35] U. Kurfüst. Solid sample analysis. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1998.

[36] M.A. Belarra, M. Resano, F. Vanhaecke, L. Moens. Direct solid sampling with electrothermal vaporization/atomization: what for and how? *Trends Anal. Chem.*, 2002, 21, 828–839.

[37] M.G.R. Vale, N. Oleszczuk, W.N.L. dos Santos. Current status of direct solid sampling for electrothermal atomic absorption spectrometry - A critical review of the development between 1995 and 2005. *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2006, 41, 377–400.

[38] D.L. Gallindo Borges, A. Furtado da Silva, B. Welz, A.J. Curtius, U. Heitmann. Determination of lead in biological samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with direct solid sampling. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, 21, 763–769.

[39] B.W. Adam, J.R. Alexander, S.J. Smith, D.H. Chace, J.G. Loeber, L.H. Elvers, W.H. Hannon. Recoveries of phenylalanine from two sets of dried-blood-spot reference materials: prediction from hematocrit, spot volume, and paper matrix. *Clin. Chem.*, 2000, 46, 126–128.

[40] J.V. Mei, J.R. Alexander, B.W. Adam, W.H. Hannon. Use of filter paper for the collection and analysis of human whole blood specimens. *J. Nutr.*, 2001, 131, 1631S–1636S.

[41] B. Welz, M. Sperling. Atomic Absorption Spectrometry, Third edition. Wiley-VCH, Weinheim, 1999.

[42] P.J. Parsons, W. Slavin. A rapid Zeeman graphite furnace atomic absorption spectrometric method for the determination of lead in blood. *Spectrochim. Acta Part B*, 1993, 48, 925–939.

[43] D.I. Bannon, C. Murashchik, C.R. Zapf, M.R. Farfel, J.J. Chisolm. Graphite furnace atomic absorption spectroscopic measurement of blood lead in matrix-matched standards. *Clin. Chem.*, 1994, 40, 1730–1734.

[44] N. Campillo, P. Viñas, I. López-García, M. Hernández-Córdoba. Rapid determination of lead and cadmium in biological fluids by electrothermal atomic absorption spectrometry using Zeeman correction. *Anal. Chim. Acta*, 1999, 390, 207–215.

[45] P. Parsons, C. Geraghty, M. Verostek. An assessment of contemporary atomic spectroscopic techniques for the determination of lead in blood and urine matrices. *Spectrochim. Acta Part B*, 2001, 56, 1593–1604.

[46] A.B. Volynsky. Comparative efficacy of platinum group metal modifiers in electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, 2004, 59, 1799–1821.

[47] M.A. Belarra, M. Resano, S. Rodríguez, J. Urchaga, J.R. Castillo. The use of chemical modifiers in the determination of cadmium in sewage sludge and tin in PVC by solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, 1999, 54, 787–795.

[48] M. Resano, M. Aramendía, A.B. Volynsky, M.A. Belarra. Solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for the direct determination of trace amounts of silicon in polyamide. Comparison of the performance of platinum and palladium as chemical modifiers. *Spectrochim. Acta Part B*, 2004, 59, 523–531.

[49] I.L. Shuttler, H.T. Delves. Determination of lead in blood by atomic absorption spectrometry with electrothermal atomisation. *Analyst*, 1986, 111, 651–656.

[50] H.C. Qiao, P. Parsons, W. Slavin. Transferability of blood lead determinations by furnace atomic-absorption spectrophotometry and continuum background correction. *Clin. Chem.*, 1995, 41, 1451–1454.

[51] M.A. Belarra, M. Resano, J.R. Castillo. Discrimination of the causes of imprecision in the direct determination of metals in organic solid samples by electrothermal atomization atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, 13, 489–494.

[52] M.A. Belarra, M. Resano, J.R. Castillo. Theoretical evaluation of solid sampling-electrothermal atomic absorption spectrometry for screening purposes. *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, 14, 547–552.

[53] W. H. Hannon, R.J. Whitley, B. Davin, P. Fernhoff, T. Halonen, M. Lavochkin, J. Miller, J. Ojodu, B.L. Therrell. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Blood collection on filter paper for newborn screening programs; approved standard—fifth edition. CLSI document LA4-A5 (ISBN 1-56238-644-1). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007.

[54] D.F. El-Hajjar, K.H. Swanson, J.D. Landmark, D.F. Stickle. Validation of use of annular once-punched filter

paper bloodspot samples for repeat lead testing. *Clin. Chim. Acta*, 2007, 377, 179–184.

[55] K. Akatsuka, I. Atsuya. Synthetic reference material for direct analysis of solid biological samples by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Chem.*, 1989, 61, 216–220.

[56] C. Bendicho, M.T.C. de Loos-Vollebregt. Solid sampling in electrothermal atomic absorption spectrometry using commercial atomizers. A review. *J. Anal. At. Spectrom.*, 1991, 6, 353–374.

[57] Centers for Disease Control and Prevention. Preventing Lead Poisoning in Young Children. A Statement by the Centers for Disease Control and Prevention. US Department of Health and Human Services. Atlanta, GA, 2005.

[58] H. Passing, W. Bablok. A new biometrical procedure for testing the equality of measurements from 2 different analytical methods. Application of linear-regression procedures for method comparison studies in clinical-chemistry. 1. *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1983, 21, 709–720.

[59] L.I.-K. Lin. A concordance correlation coefficient to evaluate reproducibility. *Biometrics*, 1989, 45, 255–268.

[60] T. Holtrop, H. Yee, P. Simpson, R. Kauffman. A community outreach lead screening program using capillary blood collected on filter paper. *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.*, 1998, 152, 455–458.

[61] P.J. Parsons, A.A. Reilly, D. Esernio-Jenssen. Screening children exposed to lead: an assessment of the capillary blood lead fingerstick test. *Clin. Chem.*, 1997, 43, 302–311.

[62] P.C. D'Haese, L.V. Lamberts, L. Liang, F.L. Van de Vyver, M.E. De Broe. Elimination of matrix and spectral interferences in the measurement of lead and cadmium in urine and blood by electrothermal atomic absorption spectrometry with deuterium background correction. *Clin. Chem.*, 1991, 37, 1583–1588.

III.2. Método de criba de plomo en sangre en los *DBS* mediante *GF-AAS* con fuente continua.

Hoy en día, la mayoría de las decisiones relacionadas con los análisis (bio)químicos se toman sobre la base de si un analito presenta una concentración por encima de un determinado valor [1,2], que puede ser un límite legal que no puede superarse (como por ejemplo, contaminantes o sustancias tóxicas en muestras medioambientales o productos alimenticios), o un umbral de conveniencia (en la mayoría de los casos basados en estudios epidemiológicos), como por ejemplo, en ciencias médicas y de la salud.

Un aspecto fundamental de los métodos analíticos prácticos es que deben "ajustarse al propósito" (*fitness for purpose* [3]) lo que expresa la necesidad de adecuar los requerimientos metodológicos a la información demandada. Por ejemplo, no parece razonable aplicar un procedimiento analítico cuantitativo, exacto y preciso, pero laborioso, para determinar un analito en muchas muestras cuando en la mayoría de ellas se espera que la concentración de aquél esté por debajo del límite de detección.

Así, por ejemplo, cuando se estudia la exposición infantil al plomo, resulta importante conocer con exactitud el contenido de plomo en la sangre en aquellos niños cuyos *BLL* estén por encima del valor umbral, pero dicha exactitud resulta irrelevante cuando la concentración esté por debajo de ese nivel.

Un excelente desarrollo de este planteamiento lo constituyen los métodos de *screening*, cuya caracterización metrológica se ha establecido en la última década [4-10]. Un sistema analítico de *screening* es un método en dos etapas. Idealmente, la primera de ellas que realiza una criba de las muestras debe ser un procedimiento simple y rápido que mediante una referencia de corte (*cut-off*) proporcione una respuesta binaria Sí/No (fuera o dentro de la población normal de referencia) y la segunda se utiliza para confirmar las situaciones consideradas anormales (Sí: fuera de la población normal de referencia) mediante un procedimiento analítico convencional.

Los conceptos básicos de la etapa de criba se esquematizan en la Tabla III.2.1.

Tabla III.2.1. Índices de exactitud y valores predictivos de una prueba de criba.

		Método de referencia		
		Verdaderos negativos	Verdaderos positivos	
Método de criba	prueba negativa	A	B	*NPV* (Valor Predictivo Negativo) = A / A+B
	prueba positiva	C	D	*PPV* (Valor Predictivo Positivo) = D / C+D
		Especificidad = A / A+C	Sensibilidad = D / B+D	
		FPR (Tasa de Falsos Positivos) = C / A+C = 1 - Especificidad	*FNR* (Tasa de Falsos Negativos) = B / B+D = 1 - Sensibilidad	

Ahora bien, en la práctica y como consecuencia de la incertidumbre de los sistemas de detección o de medida, la primera de las etapas lleva realmente a una respuesta ternaria pues además de las respuestas Sí/No, hay que aceptar la existencia de respuestas no fiables (zona dudosa o *unreliability region*).

Los sistemas de *screening* se utilizan ampliamente en los laboratorios clínicos, como por ejemplo, la detección neonatal de enfermedades metabólico-endocrinas, la detección de diabetes gestacional entre las semanas 24 y 28 de embarazo, la detección de trisomías durante el primer y/o segundo trimestre de embarazo, etc. En el ámbito clínico tanto las respuestas de la criba que resulten positivas como las no fiables deberán ser posteriormente confirmadas por métodos convencionales (que pueden ser o no procedimientos analíticos), mientras que las respuestas negativas se consideran definitivas. Por lo tanto, la probabilidad de un falso negativo (*FNR*) debe ser próxima a cero, aunque tratando de minimizar también la tasa de falsos positivos (*FPR*) [10].

Dado que estas dos magnitudes son contrapuestas, la elección de un sistema de criba más específico o más sensible dependerá de la importancia de la patología investigada y del coste y riesgo para el paciente que tenga el método de confirmación. En todo caso, es evidente que un sistema de *screening* sólo resultará práctico cuando se espere que la mayoría de las muestras proporcionen un resultado negativo (No: dentro de la población normal de referencia).

Dada la incidencia del plomo en la salud que se ha expuesto en el Apartado III.1, es normal que se hayan propuesto métodos de *screening* del mismo en varias matrices, tales como aire [11-13], capas de pintura [14,15] y agua y suelos [16]. Más próximos a los objetivos de este trabajo son los estudios de Pineau *et al*. [17] que evaluaron el equipo electroquímico portátil *LeadCare* para la primera etapa del *screening* del plomo en sangre respecto de tres valores umbrales: 100, 300 y 400 µg L^{-1}, y de Shen *et al*. [18] que estudiaron la metodología del *DBS* (recogida de sangre capilar sobre papel de filtro, troquelado de los *DBS* resultantes, extracción de la sangre de los discos obtenidos y medida del plomo en el extracto por *GF-AAS*) para detectar niños con *BLL* elevados y evaluaron su rendimiento para tres puntos de corte: 100, 150 y 200 µg L^{-1}.

Estos valores han quedado un tanto desfasados pues en 2012, el *Centers for Disease Control and Prevention* ha publicado nuevas recomendaciones [19-21]. La variación más significativa es que debe eliminarse el término *nivel de preocupación*, puesto que no hay ninguna concentración de plomo en sangre que pueda considerarse segura, de forma que

todos los niños cuyos *BLL* se encuentren por encima del percentil 97.5 de la población de referencia deben ser controlados periódicamente. La última estimación de este percentil entre los niños norteamericanos de entre 1 y 5 años es de 50 µg L^{-1} [21].

Por otra parte, puesto que la resorción ósea aumenta durante el embarazo, los fetos pueden estar expuestos al plomo movilizado desde los huesos si la madre estuvo expuesta al mismo en periodos previos de su vida [19,22]. Por esta razón, el *Centers for Disease Control and Prevention* afirma que "un análisis del plomo sanguíneo es un modo sencillo y barato de identificar las mujeres embarazadas con exposición al plomo, de forma que las fuentes de la exposición puedan identificarse y evitar un futuro contacto con este tóxico en el mejor interés de madre y niño" [19,22]. Se aboga finalmente por un *screening* selectivo de las mujeres embarazadas cuando haya habido riesgo de exposición al plomo.

En este trabajo se desarrolla un método de criba para el *screening* de plomo en los *DBS*, estudiando los valores críticos de 100 µg L^{-1} (la referencia hasta 2012) y, con más detenimiento, 50 µg L^{-1} en muestras de niños recién nacidos y mujeres embarazadas. La etapa de criba se realiza mediante *GF-AAS* con una metodología análoga a la desarrollada en el Apartado III.1. Únicamente hay que señalar que, en lugar del espectrómetro de absorción atómica de fuente de línea, se utilizó otro de fuente continua de alta resolución que se acababa de adquirir.

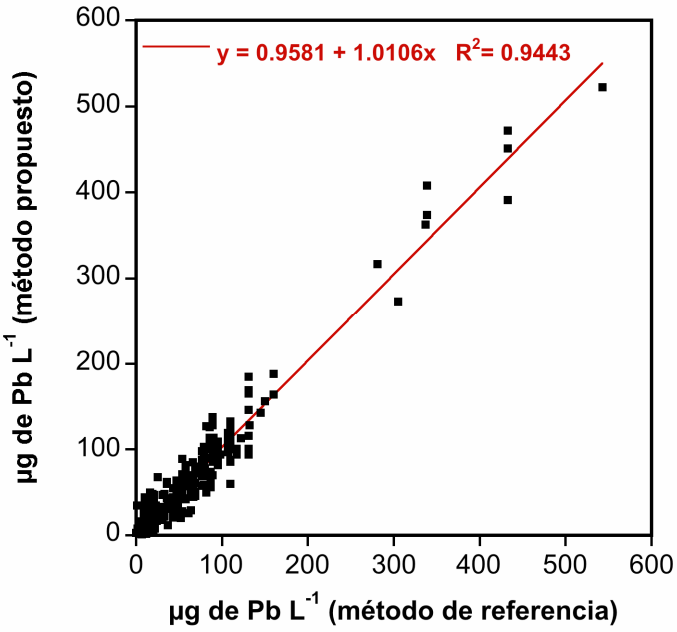
Esta instrumentación ofrece algunas ventajas indudables sobre la convencional que utiliza lámparas de cátodo hueco [23,24] y algunas de ellas fueron estudiadas para su aplicación a la medida del plomo en *DBS*. No obstante, como no resultaron relevantes, se pospone su exposición al Apartado III.3.

III.2.1. Determinación directa de plomo en los *DBS* mediante *GF-AAS* con fuente continua.

Aunque el objetivo de este apartado es desarrollar un método de *screening* adecuado para una población en la que la mayoría de las muestras se espera que estén por debajo de la concentración umbral, se comenzó comprobando que el procedimiento desarrollado para la determinación de plomo mediante *GF-AAS* con fuente de línea continuaba siendo válido cuando se trabaja con *GF-AAS* de fuente continua.

La toma y tratamiento de las muestras es idéntico a las estudiadas en el Apartado III.1 y las condiciones de medida, que se presentan en el Apartado II.5.2, son también prácticamente iguales a las de dicho apartado. Únicamente se ha utilizado la posibilidad que ofrece la fuente continua de medir un número diferente de píxeles, que se explicará en detalle en el Apartado III.3, para extender el rango lineal. Además, mientras la determinación de muestras reales con fuente de línea se había limitado a 18 pacientes, en este caso se elevó a más de 500 muestras lo que proporciona mayor seguridad sobre la concordancia entre el método propuesto y el de referencia. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura III.2.1.

Figura III.2.1. Comparación de los valores de *BLL* obtenidos por dos métodos.



En este caso la correlación obtenida con el análisis de regresión de Passing-Bablok fue: método propuesto = 0.268 + 1.024 x método de referencia. Los intervalos de confianza del 95% para la ordenada en el origen (−1.86 hasta 1.82) y para la pendiente (0.98 hasta 1.07), demuestran, de nuevo, que no existen diferencias sistemáticas ni constantes ni proporcionales entre ambos métodos. La misma conclusión se extrae del coeficiente de concordancia de Lin que en este caso es de 0.97, prácticamente igual al obtenido en el Apartado III.1 (0.98).

III.2.2. Desarrollo del modelo para la criba de plomo en sangre.

De forma general, el desarrollo de un modelo para la criba de un analito en un método de *screening* consiste en establecer las condiciones para las que la respuesta obtenida permita clasificar a la muestra, con el grado de probabilidad deseado, en una de las tres zonas que se han comentado anteriormente: Sí/dudosa/No. La forma más habitual de realizarlo es mediante la representación del tanto por ciento de respuestas Sí, frente al contenido del analito en la muestra [25].

Para el caso estudiado en este trabajo se ha utilizado la metodología descrita por Resano *et al.* [26] cuyo esquema de trabajo es el siguiente:

1) Preparar muestras con el contenido deseado en el analito y averiguar la DSR de las medidas del mismo, así como el porcentaje de resultados anómalos y la cuantía de los mismos.

2) Para cada contenido del analito generar mediante un programa informático poblaciones normales con muchos valores, que tengan como valor medio el del contenido en el analito y como DSR la obtenida en el paso anterior.

3) Sustituir aleatoriamente en cada una de estas poblaciones cierto número de valores por resultados anómalos (en el porcentaje y magnitud determinados en el punto 1).

4) Para cada población resultante tras el paso 3, calcular el porcentaje de respuestas positivas (en este caso, contenidos en plomo superiores al valor considerado crítico: 50 o 100 µg de Pb L^{-1} en cada uno de los dos casos). Con estos datos se construye la gráfica de probabilidad.

Las prestaciones de una técnica analítica como método de criba en un sistema de *screening* están relacionadas con la imprecisión que tenga como método cuantitativo de forma que, cuanto mayor sea dicha imprecisión, mayor será la zona de incertidumbre para un mismo nivel de confianza. Para realizar el estudio de la imprecisión se utilizaron cuatro muestras de sangre con contenidos en plomo de 39, 58, 86 y 152 µg Pb L^{-1}, los dos primeros por debajo y encima de la concentración crítica de 50 µg Pb L^{-1} y los dos últimos de la de 100 µg Pb L^{-1}.

Una vez preparados los *DBS* a partir de estas muestras, se realizaron 24 determinaciones de cada una de ellas siguiendo el procedimiento operativo que se detalla en el Apartado II.5.2, obteniendo cada resultado como la mediana de la medida de plomo en cinco discos. Si bien la imprecisión de estos valores osciló entre valores de DSR del 6 y el 10%, similares a los obtenidos para el *CRM* con el equipo de fuente de línea (Apartado III.1.5), la DSR considerando el total de las 120 réplicas individuales realizadas para cada una de las muestras fue, como es lógico, algo mayor, en concreto 20.1%, 18.8%, 21.5% y 19.1% para las muestras de 38, 59, 86 y 152 µg de Pb L^{-1}, respectivamente. Dado que no parece haber diferencias significativas entre estos valores, se asumió un valor de DSR igual para todo el rango de concentraciones estudiado, eligiendo el de 21.5% que fue el peor de los obtenidos.

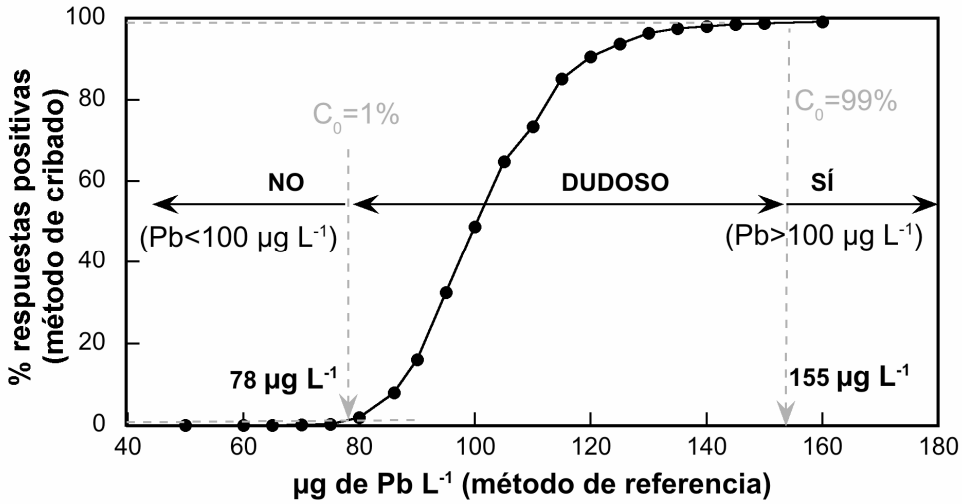
Un aspecto adicional que debe valorarse en las determinaciones directas sobre sólidos mediante *GF-AAS* es la aparición de resultados anómalos [27]. Utilizando el criterio de media $\pm$ 3 desviaciones estándar, en las medidas anteriores se observó la aparición de aproximadamente un 4% de resultados anómalos. Además, contrariamente a lo que suele ser habitual [28], se dio una mayor incidencia (80%) de anómalos por defecto que por exceso.

A continuación, mediante una hoja de cálculo *Excel* se generaron una serie de poblaciones normales, todas ellas con 10 000 valores y una DSR del 21.5%, pero cada una con una valor medio diferente, cubriendo los rangos entre 50 y 160 µg de Pb L^{-1} para el estudio del valor crítico de 100 µg de Pb L^{-1} y entre 25 y 100 µg de Pb L^{-1} para el valor crítico de 50 µg de Pb L^{-1}. Además, un 4% de los valores de cada población fue sustituido de forma aleatoria por resultados anómalos (el 80% de los mismos se sustituyó por el valor medio dividido entre tres y el 20% restante el valor medio multiplicado por cinco tercios), para simular la incidencia y la cuantía de los mismos.

Los 10 000 valores finales de cada población se agruparon en series de tres (también de cinco y de diez) y se calculó la mediana de los mismos, lo que simula realizar tres medidas (o cinco, o diez) por cada muestra. Estos resultados se compararon con el valor crítico (50 o 100 µg de Pb L^{-1}) y de esta forma se obtuvo el porcentaje de respuestas positivas para cada concentración simulada.

La Figura III.2.2 muestra los resultados obtenidos con esta simulación para un valor umbral de 100 µg de Pb L^{-1}. Si se asumiera un 1% de falsos negativos (C_o=1%) y de falsos positivos (C_o=99%) las zonas No/dudoso/Sí quedarían limitadas por los valores 78 y 155 µg de Pb L^{-1}.

Figura III.2.2. Gráfica de probabilidad *vs* concentración del método de criba propuesto para un contenido de 100 µg de Pb L^{-1}, utilizando la mediana de 3 réplicas.



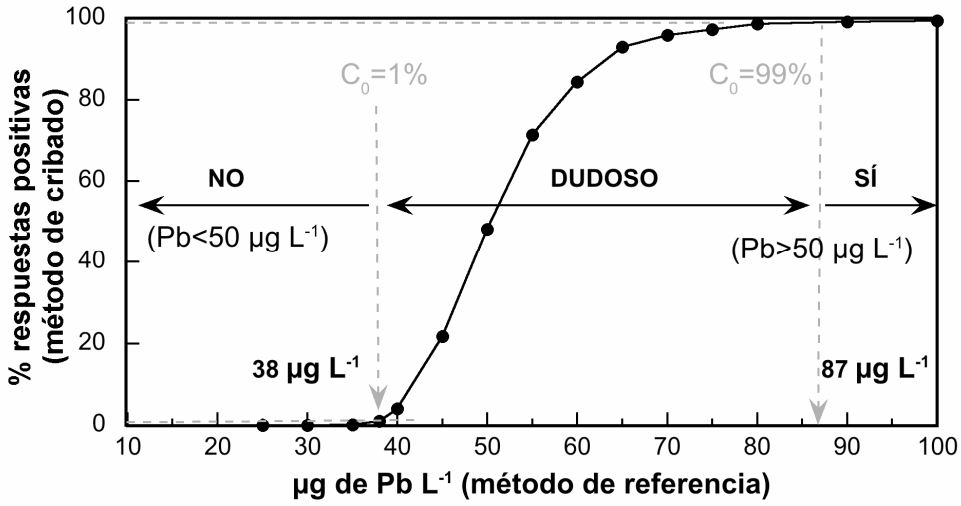
Sin embargo, como se ha comentado anteriormente, lo habitual en los cribados clínicos, es que tanto los resultados positivos como los dudosos sean sometidos a un método de confirmación. Por lo tanto, en este caso, la situación de tres posibles respuestas se manejará en realidad como una respuesta binaria: No/Confirmación (Sí + dudoso). Por lo tanto sólo será necesario utilizar un valor de corte.

Queda finalmente por fijar dicho valor. En este caso parece razonable establecerlo de tal modo que se garantice una tasa de falsos negativos muy baja, de forma que todos los niños en riesgo de sufrir toxicidad por plomo serán convenientemente controlados. Una valor de un 1% parece un riesgo asumible y así, para aquellos *DBS* cuya concentración medida sea inferior a 78 µg L^{-1}, existirá un 99% de probabilidad de que su concentración real sea inferior a 100 µg L^{-1}.

La eficacia del modelo puede mejorarse fácilmente incrementando el número de réplicas por muestra. Así, para cinco medidas el valor de corte pasaría a ser de 82 µg L^{-1} y para diez réplicas de 87 µg L^{-1}. Sin embargo, realizar más de tres réplicas no sería muy práctico como método de criba, ya que incrementará el tiempo de trabajo para cada muestra, requerirá un número mayor de discos procedentes del *DBS* (no siempre disponibles) y sólo disminuirá ligeramente la tasa de falsos positivos, ya que es de esperar que la mayoría de muestras estén por debajo de cualquiera de los puntos de corte antes mencionados. De esta forma, con tres réplicas se obtiene la mayor productividad, con una aceptable proporción de falsos positivos.

Los resultados obtenidos para el valor crítico de 50 µg Pb L^{-1}, que se presentan en la Figura III.2.3, presentan características semejantes a los estudiados anteriormente.

Figura III.2.3. Gráfica de probabilidad *vs* concentración del método de criba propuesto para un contenido de 50 µg de Pb L^{-1}, utilizando la mediana de 3 réplicas.



Por las mismas consideraciones que en el caso anterior, se llega a la conclusión de que utilizando un valor de corte de 38 µg Pb L^{-1} existe una probabilidad del 99% de que la concentración de plomo en esa muestra sea inferior a 50 µg L^{-1} cuando se determina por el método de referencia. En este caso, el incremento del número de réplicas por muestra a cinco o diez desplazaría el punto de corte a 41 o 44 µg L^{-1}, respectivamente.

III.2.3. Resultados de la criba de plomo en sangre.

Una vez establecido el modelo de criba (número de réplicas por muestra y punto de corte para cada uno de los valores umbrales), se procedió a su validación mediante su aplicación a muestras reales, siguiendo el procedimiento descrito en el Apartado II.5.3. Se estudiaron un total de 526 pacientes, de ellos 229 recién nacidos, 185 mujeres embarazadas y otros 112 pacientes.

Para la evaluación del procedimiento de criba se han considerado como verdaderos los valores obtenidos para cada muestra con el método de referencia (sangre líquida y medida de su contenido en plomo por *GF-AAS*). Además, es necesario advertir que el conjunto de muestras estudiadas en este trabajo representa una población sesgada ya que, para asegurar la presencia en la muestra de situaciones en las que el *BLL* fuera elevado, se contactó con algunos pacientes adultos cuyos análisis previos presentaban esta situación.

En la Tabla III.2.2 se presentan los resultados obtenidos con el método de criba propuesto para los valores críticos de 100 µg L^{-1} y de 50 µg L^{-1}. En este último caso los resultados se muestran en conjunto y para cada una de las dos poblaciones de interés, esto es, neonatos y mujeres embarazadas.

Tabla III.2.2. Resultados obtenidos para el método de criba de plomo en los *DBS* para los valores críticos de 100 µg L^{-1} y de 50 µg L^{-1}.

Valor umbral de 100 µg L^{-1}		**Método de referencia**	
		<100 µg L^{-1}	>100 µg L^{-1}
Método propuesto	<78 µg L^{-1} cribado negativo	437	1
	>78 µg L^{-1} cribado positivo	40	48

Valor umbral de 50 µg L^{-1}			**Método de referencia**	
			<50 µg L^{-1}	>50 µg L^{-1}
Método propuesto	**todas las muestras**	<38 µg L^{-1} cribado negativo	359	4
		>38 µg L^{-1} cribado positivo	50	113
	recién nacidos	<38 µg L^{-1} cribado negativo	194	0
		>38 µg L^{-1} cribado positivo	32	3
	mujeres embarazadas	<38 µg L^{-1} cribado negativo	165	0
		>38 µg L^{-1} cribado positivo	18	2

La primera impresión de los resultados es que el sistema de criba funciona satisfactoriamente. Con el valor crítico de 100 µg L^{-1}, el sistema clasificó correctamente 485 de las 526 muestras, con un solo falso negativo, mientras que si dicho valor se sitúa en 50 µg L^{-1}, los resultados correctos fueron 472 con cuatro falsos negativos, ninguno de los cuales corresponde a las poblaciones de riesgo.

Puede argüirse que el sistema de criba se ha aplicado a una situación donde la mayoría de las muestras se encontraban con claridad por debajo de los valores críticos, especialmente si este es de 100 µg L^{-1} (ver la Figura III.2.1), pero como se ha indicado en la introducción de este apartado, este es un requisito básico para que un sistema de criba sea eficaz.

De hecho, en situaciones reales donde podría implantarse el modelo de criba propuesto, es de esperar que la mayoría de las muestras presenten valores de *BLL* por debajo del valor umbral de 50 µg L^{-1}, tanto para niños como para mujeres embarazadas. Así, se estima que en EEUU sólo lo superan un 1% de todas las mujeres en edad fértil (aunque esto supone 600,000 mujeres) [29] y un 2.5% (por el propio establecimiento de este umbral) de niños hasta 5 años de edad (450,000 niños) [21].

Pasando de las impresiones a los resultados cuantitativos, en la Tabla III.2.3 se presentan los valores característicos (índices de exactitud y valores predictivos) obtenidos con la aplicación del método de criba propuesto.

Tabla III.2.3. Valores característicos del método de criba desarrollado.

	Valor umbral ($\mu g\ L^{-1}$)	Prevalencia (%)	Punto de corte ($\mu g\ L^{-1}$)	Sensibilidad (%)	Especificidad (%)	*FNR* (%)	*FPR* (%)	*NPV* (%)	*PPV* (%)
todas las muestras (n = 526)	100	9.3	78	98.0	84.8	2.0	15.2	99.6	54.5
todas las muestras (n = 526)	50	21.7	38	96.6	87.8	3.4	12.2	98.9	83.3
recién nacidos (n = 229)	50	1.3	38	100	85.8	0	14.2	100	8.6
mujeres embarazadas (n = 185)	50	1.1	38	100	90.2	0	9.8	100	10.0

El dato que se considera más importante, la sensibilidad, se mantiene en todos los casos por encima del 96%, alcanzándose el óptimo del 100% (0% de falsos negativos) en el caso de los dos grupos de mayor interés, mujeres embarazadas y niños con un valor crítico de 50 $\mu g\ L^{-1}$. Aunque parezca que el número de casos a detectar en estas situaciones, dos niños y tres mujeres, es muy escaso, no está demasiado alejado del que resultaría de aplicar a la población estudiada el porcentaje estimado en EEUU que se ha citado anteriormente (siete casos).

En cuanto a la especificidad, los distintos valores se sitúan entre el 85-90% lo que puede considerarse satisfactorio. Es cierto que el método de criba obligaría a utilizar el método confirmatorio, de forma innecesaria, en aproximadamente un 12% de los casos estudiados para los dos grupos de riesgo (50 falsos positivos sobre 414 muestras) pero, como se ha indicado en la introducción de este apartado, este es el precio que debe pagarse en un sistema de criba para lograr una sensibilidad diagnóstica cercana al 100%.

De hecho, la mayoría de los falsos positivos obtenidos para estas dos poblaciones corresponden a muestras que en el método de criba dieron valores por encima de 38 $\mu g\ L^{-1}$ (punto de corte del mismo) y por el método de referencia proporcionaron valores por debajo de 50 $\mu g\ L^{-1}$ (valor umbral que define los verdaderos positivos). Es decir, los dos sistemas de medida funcionaron correctamente y la causa de los falsos positivos debe atribuirse al margen de seguridad del sistema de criba diseñado.

No obstante, los resultados de la Tabla III.2.3 deben matizarse con dos consideraciones. En primer lugar, el número de muestras sometidas al método de criba es bastante reducido desde el punto de vista estadístico por lo que los datos de dicha tabla deben considerarse únicamente como indicativos de las características del método.

Por otra parte, aunque habitualmente se considera que la prevalencia sólo incide en los valores predictivos positivo y negativo, sin hacerlo en la sensibilidad y la especificidad, esto no es correcto [30,31]. En efecto, la exactitud diagnóstica de una criba está fuertemente influida por la población estudiada, tanto por el porcentaje de muestras positivas (prevalencia) como por el valor real de dichas muestras. Es evidente que no tiene la misma dificultad discriminar un 10% de muestras como superiores a un valor de 100 (por ejemplo), cuando dichas muestras tienen un valor de 200 que cuando lo tienen de 105.

Pues bien, como se ha indicado anteriormente, la mayoría de muestras positivas corresponden a pacientes adultos que fueron seleccionados porque tenían análisis previos con elevados valores de *BLL*. Este sesgo puede contribuir a que sólo se obtenga un falso negativo

para el umbral de 100 µg L^{-1}, y tres más para el de 50 µg L^{-1}. Efectivamente, estos últimos corresponden a muestras de pacientes adultos cuyos *BLL,* determinados por el método de referencia, estaban justo por encima de 50 µg L^{-1}.

En todo caso, el método desarrollado se puede comparar ventajosamente con otros descritos previamente. Shen *et al*. [18] también evaluaron una metodología basada en *DBS* como método de criba para evaluar el *BLL* de niños en China, considerando como valores críticos los de 100 µg L^{-1}, 150 µg L^{-1} y 200 µg L^{-1}. Sin embargo su trabajo está lastrado desde el origen por haber un utilizado un modelo de criba un tanto primario ya que, al no considerar la existencia de una región de resultados dudosos, los puntos de corte se igualaron con los valores críticos.

La consecuencia inmediata de utilizar este modelo tan simple en lugar de uno que tenga en cuenta la incertidumbre es que aumenta la especificidad (se producen menos falsos positivos) pero a costa de disminuir la sensibilidad (se producen más falsos negativos). Por ejemplo, para el valor crítico de 100 µg L^{-1}, el *FNR* obtenido por Shen *et al*. fue del 15.0%, mientras que con el modelo propuesto en este trabajo este valor es el 2.0%. Esta pérdida de sensibilidad es muy grave pues un porcentaje significativo de pacientes cuyos *BLL* están por encima del valor umbral se clasifican incorrectamente como negativos y no recibirán la debida atención médica. Hay que hacer constar que estas deficiencias se deben atribuir al modelo del método de criba y no implican necesariamente que el sistema de medida utilizado sea incorrecto.

Por otra parte, Pineau *et al*. evaluaron las prestaciones del instrumento *LeadCare* como un sistema de criba de plomo en sangre para los valores críticos de 100 µg L^{-1}, 300 µg L^{-1} y 400 µg L^{-1} [17]. En este estudio se tuvo en cuenta la zona de incertidumbre por lo que se fijaron los valores de corte en 30 µg L^{-1}, 175 µg L^{-1} y 271 µg L^{-1}, para cada uno de los valores críticos. Ahora bien, la incertidumbre del método parece inasumible para un método de criba ya que la enorme diferencia entre los valores críticos y los valores de corte incrementará la aparición de falsos positivos. Si se tiene en cuenta que dicha diferencia aumenta porcentualmente cuanto menor es la concentración crítica, parece difícil pensar que este sistema sea apropiado para el control de los 50 µg L^{-1} de *BLL* que se realiza en la actualidad.

En este caso los problemas parecen debidos al sistema de medida electroquímica utilizado por el instrumento, que presentaba un importante error sistemático negativo. Aunque en un principio se achacó a modelos defectuosos de la primera generación [32,33], la version posterior *LeadCare II Blood Lead Analyser* no parece haber mejorado la situación [34,35].

En resumen, a la vista de los resultados obtenidos, y aun con las limitaciones apuntadas, las prestaciones del método de criba de plomo en los *DBS* desarrollado en este trabajo, resultan satisfactorias tanto para el antiguo valor umbral de 100 µg L^{-1} como para el actual de 50 µg L^{-1}. Esta afirmación se corrobora por el hecho de que se ajusta a la normativa europea [5] que exige que el *FNR* sea inferior al 5% (el peor caso de este estudio tiene un *FNR* de 3.4) y el límite de detección sea inferior al 10% del valor umbral, es decir, 5 µg L^{-1} (el calculado en el Apartado III.1 para el método desarrollado con el equipo de fuente de línea es de 2.5 µg L^{-1}, mientras que resultó de 1.0 µg L^{-1} con el equipo de fuente continua, como se mostrará en el Apartado III.3: Tabla III.3.1).

III.2.4. Conclusiones

La determinación directa de plomo en los *DBS*, realizada con la moderna técnica de *GF-AAS* de alta resolución con fuente continua presenta unas características semejantes a las obtenidas mediante *GF-AAS* convencional. Evidentemente, poco podía aportar la nueva técnica a una determinación monoelemental que no presentaba ninguna dificultad especial. Únicamente se ha aprovechado la posibilidad de expandir con facilidad el rango lineal, para realizar de forma más sencilla las determinaciones en el caso de muestras con contenidos anómalamente elevados de plomo.

Se ha desarrollado un modelo para la etapa de criba de un sistema de *screening* que permita discriminar dos posibles valores críticos de plomo en sangre, 50 o 100 µg Pb L^{-1}. Dadas las buenas características del procedimiento, y en aras a una mayor rapidez en la obtención de resultados, se ha disminuido de cinco a tres el número de medidas sobre cada *DBS*. En estas condiciones, y asumiendo que la DSR del procedimiento se mantiene esencialmente constante en todo el rango de concentraciones de interés, se han establecidos valores de corte de 38 y 78 µg Pb L^{-1}, para cada uno de los dos valores críticos anteriores.

La calidad del método propuesto se ha comprobado aplicándolo a más de 500 muestras, cuyo contenido en plomo se determinó también por el procedimiento convencional. La sensibilidad (detección de verdaderos positivos) fue superior al 95% (del 100% en los casos más importantes de recién nacidos y mujeres embarazadas, con un valor crítico de 50 µg Pb L^{-1}) y la especificidad (detección de verdaderos negativos) osciló entre el 85% y el 90%. Aunque desde el punto de vista del análisis clínico el número de muestras sea más bien modesto, por lo que es escaso el número de verdaderos positivos, estos resultados resultan alentadores.

Si la facilidad de la toma de muestra sobre los *DBS* permite el establecimiento de *protocolos de recolección de muestras en el hogar* lo que podría servir para aumentar la participación en programas a gran escala de control del plomo en mujeres embarazadas y niños pequeños (incluyendo neonatos), el disponer de un sistema de criba rápido y fiable puede simplificar de forma notable el trabajo de los laboratorios clínicos.

III.2.5. Bibliografía

[1] M. Valcárcel, S. Cárdenas. Current and future screening systems. Anal. Bioanal. Chem., 2005, 381, 81–83.

[2] M. Valcárcel, S. Cárdenas. Modern qualitative analysis. Trends Anal. Chem., 2005, 24, 467.

[3] M. Thompson, T. Fearn. What exactly is fitness for purpose in analytical measurement? Analyst, 1996, 121, 275–278.

[4] M. Valcárcel, S. Cárdenas, M. Gallego. Sample screening systems in analytical chemistry. Trends Anal. Chem., 1999, 18, 685–694.

[5] Commission Decision. Metrology of qualitative chemical analysis, EUR 20605 EN. Off. J. Eur. Commun., 2002/657/EC.

[6] A. Ríos, D. Barcel, L. Buydens, S. Cardenas, K. Heydorn, B. Karlberg, K. Klemm, B. Lendl, B. Milman, B. Neidhart, R.W. Stephany, A. Townshend, A. Zschunke, M. Valcárcel. Quality assurance of qualitative analysis in the framework of the European project "MEQUALAN," Accred Qual Assur., 2003, 8, 68–77.

[7] S.L.R. Ellison, T. Fearn. Characterising the performance of qualitative analytical methods: Statistics and terminology. Trends Anal. Chem., 2005, 24, 468–476.

[8] S. Cardenas, M. Valcárcel. Analytical features in qualitative analysis. Trends Anal. Chem., 2005, 24, 477–487.

[9] A. Ríos, H. Téllez. Reliability of binary analytical responses. Trends Anal. Chem., 2005, 24, 509–515.

[10] E. Trullols, I. Ruisanchez, F.X. Rius, J. Huguet. Validation of qualitative methods of analysis that use control samples. Trends Anal. Chem., 2005, 24, 516–524.

[11] M. Kolb, A. Bahr, S. Hippich, W. Schulz. Calculation of detection limit, identification limit and determination limit according to DIN 32645 with the aid of a computer program. Acta Hydrochim. Hydrobiol., 1993, 21, 308–311.

[12] K. Ashley, T.J. Fischbach, R.G. Song. Evaluation of a chemical spot-test kit for the detection of airborne particulate lead in the workplace. Am. Ind. Hyg. Assoc. J., 1996, 57, 161–165.

[13] Lead in air by chemical spot test: method 7700. NIOSH Manual of analytical methods, Fourth Edition, 1996, issue 1.

[14] ASTM Standard Guide for evaluating the performance characteristics of qualitative chemical spot test kits for lead in paint (ASTM A 1828-96), West Conshohocken: ASTM, 1996.

[15] K. Ashley, M. Hunter, L.H. Tait, J. Dozier, J.L. Seaman, P.F. Berry. Field investigation of on-site techniques for the measurement of lead in paint films. Field Anal. Chem. Technol., 1998, 2, 39–50.

[16] J. Cooper, J.A. Bolbot, S. Saini, S.J. Setford. Electrochemical method for the rapid on site screening of cadmium and lead in soil and water samples. Water Air Soil Pollut., 2007, 179, 183–195.

[17] A. Pineau, B. Fauconneau, M. Rafael, A. Viallefont, O. Guillard. Determination of lead in whole blood: comparison of the LeadCare blood lead testing system with Zeeman longitudinal electrothermal atomic absorption spectrometry. J. Trace Elem. Med. Biol., 2002, 16, 113–117.

[18] X.-M. Shen, Y.-W. Zhang, S.-H. Wu, C.-H. Yan, J.-M. Ying, R.-Q. Li. Applicability of a filter paper method to measure blood lead levels in large populations of Chinese children. Clin. Chim. Acta, 2003, 328, 99–104.

[19] Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for the identification and management of lead exposure in pregnant and lactating women. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, GA, 2010. http://www.cdc.gov/nceh/lead/publications/leadandpregnancy2010.pdf (last accessed 28-03-2014)

[20] Centers for Disease Control and Prevention. CDC Response to Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention Recommendations in “Low Level Lead Exposure Harms Children: A Renewed Call of Primary Prevention”. Atlanta, GA, 2012. http://www.cdc.gov/nceh/lead/acclpp/acclpp_main.htm (last accessed 28-03-2014).

[21] Centers for Disease Control and Prevention. Low Level Lead Exposure Harms Children: A Renewed Call for Primary Prevention. Report of the Advisory Committee on Childhood Lead Poisoning Prevention. U.S. Department of Health and Human Services. Atlanta, GA, (2012). http://www.cdc.gov/nceh/lead/acclpp/final_document_030712.pdf (last accessed 28-03-2014).

[22] Committee on Obstetric Practice. American College of Obstetricians and Gynecologists. Committee opinion no. 533: lead screening during pregnancy and lactation. Obstet. Gynecol., 2012, 120, 416–420.

[23] B. Welz, D.L.G. Borges, F.G. Lepri, M.G.R. Vale, U. Heitmann. High-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry — An analytical and diagnostic tool for trace analysis. Spectrochim. Acta Part B, 2007, 62, 873–883.

[24] M. Resano, E. García-Ruiz. High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry: is it as good as it sounds? A critical review. Anal. Bioanal. Chem., 2011, 399, 323–330.

[25] R. Song, P. Schlecht, K. Ashley. Field screening test methods: performance criteria and performance characteristics. J. Hazardous Mater., 2001, 83, 29–39.

[26] M. Resano, E. García-Ruiz, M. Aramendía, M.A. Belarra. Solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for Hg monitoring in soils. Performance as a quantitative and as a screening method. J. Anal. At. Spectrom., 2005, 20, 1374–1380.

[27] M.A. Belarra, M. Resano, J.R. Castillo. Theoretical evaluation of solid sampling-electrothermal atomic absorption spectrometry for screening purposes. J. Anal. At. Spectrom., 1999, 14, 547–552.

[28] U. Kurfürst. Statistical treatment of ET-AAS (electrothermal atomization - atomic-absorption spectrometry) solid sampling data of heterogeneous samples. Pure Appl. Chem., 1991, 63, 1205–1211.

[29] B.M. Kuehn. CDC advises pregnancy lead screening that targets populations at risk. JAMA, 2011, 305, 347–347.

[30] H. Brenner, O. Gefeller. Variation of sensitivity, specificity, likelihood ratios and predictive values with disease prevalence. Stat. Med., 1997, 16, 981–991.

[31] M.M.G. Leeflang, P.M.M. Bossuyt, L. Irwig. Diagnostic test accuracy may vary with prevalence: implications for evidence-based diagnosis. J. Clin. Epidemiol., 2009, 62, 5–12.

[32] N.V. Stanton, T. Fritsch, C. Geraghty, M.F. Verostek, B. Weiner, P.J. Parsons. The role of proficiency testing in the detection and resolution of calibration bias in the LeadCare blood lead analyzer; limitations of peer-group assessment. Accred. Qual. Assur., 2006, 11, 590–592.

[33] R.M. Bossarte, M.J. Brown, R.L. Jones. Blood lead misclassification due to defective LeadCare blood lead testing equipment. Clin. Chem., 2007, 53, 994–995.

[34] K. Bischoff, C. Gaskill, H.N. Erb, J.G. Ebel, J. Hillebrandt. Comparison of two methods for blood lead analysis in cattle: graphite-furnace atomic absorption spectrometry and Leadcare II system. J. Vet. Diagn. Invest., 2010, 22, 729–733.

[35] C. Sobin, N. Parisi, T. Schaub, E. Riva. A Bland–Altman comparison of the Lead Care system and inductively coupled plasma mass spectrometry for detecting low-level lead in child whole blood samples. J. Med. Toxicol., 2011, 7, 24–32.

III.3. Evaluación de posibles ventajas de la *GF-AAS* con fuente continua para determinaciones en sangre y orina.

La reciente comercialización de la espectrometría de absorción atómica de alta resolución con fuente continua puede suponer una importante renovación para esta técnica analítica. Esto puede parecer paradójico si se tiene en cuenta que los primeros trabajos de absorción atómica (Fraunhofer, Bunsen, Kirchhoff, Lockyer y otros en el siglo XIX) se realizaron con fuente continua, que era la única disponible en la época, aunque sus pobres prestaciones hicieron que la espectrometría de emisión atómica fuera la técnica atómica preferida durante mucho tiempo [1].

La principal razón de esta prevalencia es que resulta mucho más sencillo cuantificar una radiación, por pequeña que sea su intensidad, sobre un fondo prácticamente transparente (emisión) que cuantificar la minúscula pérdida en la intensidad total de una fuente continua (extendida a lo largo de cientos de nanómetros) producida por la absorción de líneas atómicas (de unos pocos picómetros). Para lograrlo hubiera sido necesario un monocromador que proporcionara una anchura de banda espectral del orden de magnitud de la anchura de las líneas atómicas.

A mediados del siglo pasado Walsh logró reintroducir con gran éxito la absorción atómica como técnica de análisis elemental soslayando esta dificultad. En lugar de utilizar una fuente continua usó una fuente de líneas producidas por la emisión atómica del elemento a determinar (lámpara de cátodo hueco), de forma que la labor del monocromador consistía simplemente en separar la línea utilizada para la medida del resto de las emitidas por la fuente. Todos los dispositivos comerciales construidos a lo largo de cinco décadas se han basado en este principio.

Pese al espectacular desarrollo de la absorción atómica con fuente de línea hubo investigadores que retomaron la posibilidad de utilizar una fuente continua, de forma que se evitara la necesidad de disponer de una lámpara para cada elemento (elevado coste económico e incomodidad de almacenamiento) y se superara el carácter monoelemental de las determinaciones (lentitud cuando hay que determinar varios analitos en la misma muestra). Los trabajos se encaminaron a obtener una fuente continua de alta intensidad, buena estabilidad y amplio intervalo espectral y, sobre todo, a desarrollar un sistema de monocromación de alta resolución.

Tras los avances que supusieron los trabajos de Keliher y Wohlers que utilizaron por primera vez una red de difracción en *échelle*, con una resolución muy superior a los sistemas convencionales [2], y los del grupo de Harnly, que propuso el empleo de una fuente pulsada y un detector de fotodiodos en *array* [3-6], finalmente fue el grupo de Becker-Ross del *Institute of Spectrochemistry and Applied Spectroscopy* (ISAS) de Berlín el que resolvió el problema, aprovechando los avances anteriores pero dándole un enfoque más radical.

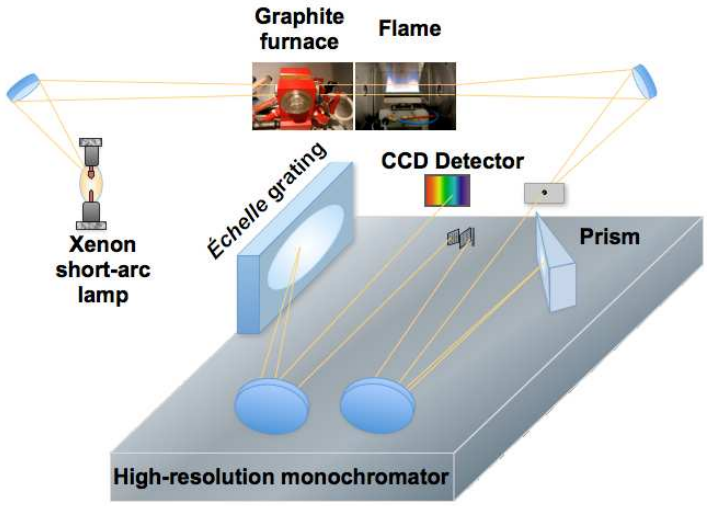
En lugar de intentar adaptar la instrumentación existente, se plantearon desde el principio las necesidades de un dispositivo de fuente continua en lo relativo a la fuente de radiación [7,8], el monocromador [9-11] y el detector [7,10,12] y diseñaron un nuevo instrumento de espectroscopía de absorción atómica de alta resolución con fuente continua.

Componentes básicos de un espectrómetro de absorción atómica de alta resolución con fuente continua.

Los instrumentos que comercializó a finales de la década pasada la empresa alemana *Analytik Jena* (ContrAA 300 con atomizador de llama y ContrAA 700 que cuenta con

atomizadores de llama y de cámara de grafito en línea) siguen el prototipo propuesto por el grupo de Becker-Ross y su diseño básico se muestra en la Figura III.3.1.

Figura III.3.1. Componentes básicos de un espectrómetro de absorción atómica de alta resolución con fuente continua [13].



Sus componentes principales son [1]:

1) Una lámpara de arco corto de xenón como fuente continua. Las lámparas convencionales de xenón no tienen suficiente energía en la zona del ultravioleta, en la que se encuentran la mayoría de las líneas de interés para las determinaciones por *AAS*. Por el contario, la lámpara que se utiliza en este instrumento trabaja a alta presión (17 bar, en frío) en el modo que se denomina *hot spot*, alcanzando temperaturas de alrededor de 10000 K en el pequeño plasma generado en su interior. Estas lámparas permiten cubrir el espectro entre 190 y 980 nm y su intensidad de emisión es al menos 10 veces mayor que la de las lámparas convencionales de xenón alcanzando una intensidad 100 veces mayor en el rango de UV lejano. Asimismo tienen una intensidad unas 100 veces superior a las lámparas de cátodo hueco convencionales en el rango espectral completo.

2) Una unidad de atomización. Esta parte es igual que la de los instrumentos con fuente de línea, pudiendo realizarse la atomización con llama o electrotérmica.

3) Un sistema monocromador de alta resolución. El sistema propuesto para esta instrumentación consiste en un sistema doble de dispersión: un prisma de 300 mm que actúa como pre-monocromador y una red de difracción en *echélle* de 400 mm. La radiación emitida por la lámpara de xenón entra al monocromador a través de una ranura y es dirigida mediante unos espejos parabólicos sobre el prisma que provoca la dispersión de la radiación. Mediante la oportuna rotación del prisma, se dirige la zona de longitudes de onda de interés, a través de una ranura, hacia la red en *echélle* consiguiendo una resolución de 1-2 picómetros (1.1 pm a 200 nm).

4) Un detector *CDC* (*charge-coupled device*, dispositivo de carga acoplada). El sistema detector consiste en un *CCD* de matriz lineal con 512 píxeles (elementos de imagen), 200 de los cuales se utilizan con fines analíticos. Como cada píxel funciona

simultáneamente de forma independiente, realmente se dispone de 200 detectores lo que permite medir, no sólo la longitud de onda de interés, sino también su entorno inmediato.

Ventajas potenciales de la AAS de alta resolución con fuente continua.

De la descripción anterior se podía prever que la *AAS* de alta resolución con fuente continua iba a proporcionar una serie de ventajas sobre la convencional *AAS* con fuente de línea y, la mayoría de ellas, se han confirmado con los trabajos realizados durante los últimos años [13,14]:

1) Mejora en la fiabilidad de la medida. La medida simultánea de 200 píxeles (sectores de longitud de onda) hace que se haga "visible" todo el entorno de la línea medida. De hecho, el sistema va a funcionar como un dispositivo simultáneo de doble haz, lo que permite una corrección muy eficiente de bastantes efectos indeseados, como oscilaciones temporales de la fuente de emisión, pequeños cambios en la transmisión del atomizador o en la sensibilidad del detector.

2) Mejora en los límites de detección. Como consecuencia de lo anterior y de la mayor intensidad de radiación de la lámpara de xenón comparada con la de cátodo hueco, se mejora el límite de detección en un factor de tres a cinco veces.

3) Mejora en la corrección de la absorción inespecífica. Al poder medir simultáneamente el entorno de la longitud de onda de interés, se pueden corregir mucho mejor interferencias espectrales, incluso en el caso de señales de fondo debidas a procesos que cambian muy rápidamente o a espectros de estructura hiperfina, difíciles de solventar con los sistemas de corrección convencionales.

4) Control de la sensibilidad y del rango lineal. Con la *AAS* de alta resolución con fuente continua es posible disminuir la sensibilidad de las medidas, utilizando un número menor de píxeles o eligiendo los de las alas de la señal en lugar de los centrales. Esta posibilidad, de poca importancia cuando se trabaja con muestras disueltas, es muy relevante en las determinaciones directas sobre muestras sólidas ya que éstas no se pueden diluir.

5) Posibilidad de determinar elementos no metálicos, como flúor, cloro, fósforo o azufre. Estos elementos tienen sus líneas atómicas más sensibles en el UV lejano y no pueden utilizarse con la instrumentación tradicional. Sin embargo, la *AAS* de alta resolución con fuente continua es capaz de utilizar las estrechas líneas de absorción molecular, principalmente aquellas que corresponden a transiciones rotacionales que tienen una anchura media de unos pocos picómetros, semejante al de las líneas atómicas.

6) Posibilidad de realizar determinaciones multielementales. Si se trabaja con atomización en llama se tiene una señal continua y se puede realizar un análisis multielemental secuencial de forma muy sencilla cambiando la longitud de onda de medida. Pero si la atomización es electrotérmica, la señal es transitoria por lo que no es posible trabajar de forma secuencial y las posibilidades multielementales están limitadas por el rango de longitudes de onda que puede medir simultáneamente el detector. Dado que dicho intervalo está limitado a 0.2-0.5 nm (en función de la zona del espectro) sólo se pueden realizar estas determinaciones para elementos con líneas atómicas muy próximas.

En este apartado se describen las experiencias realizadas tras la adquisición del ContrAA 700 para evaluar algunas de sus nuevas posibilidades en el ámbito del análisis clínico. Para la determinación de plomo sobre los *DBS* se estudiaron las posibles interferencias espectrales y la posibilidad de controlar la sensibilidad y el rango lineal mediante el uso de distintos píxeles de la señal. Por otra parte, se hicieron estudios sobre la determinación de níquel en sangre y orina líquidas en los que se exploró una nueva aplicación del potencial multielemental de la técnica, la de mejorar la calidad de las medidas (corrección de efectos de matriz muy habituales en este tipo de muestras cuando se analizan por *GF-AAS* y mejora de la precisión) mediante el uso de un patrón interno. Las posibilidades de realizar verdaderas determinaciones multielementales se estudiarán en el Apartado III.4.

La utilidad de la medida de plomo en sangre se ha tratado extensamente en los dos capítulos anteriores, mientras que el interés de la determinación de metales en sangre y orina se comentará en los apartados posteriores de esta Memoria. En concreto, el níquel con el que se trabaja en este apartado, se ha estudiado en la evaluación del funcionamiento de implantes espinales [15].

III.3.1. Estudio de interferencias espectrales en las medidas de plomo en sangre.

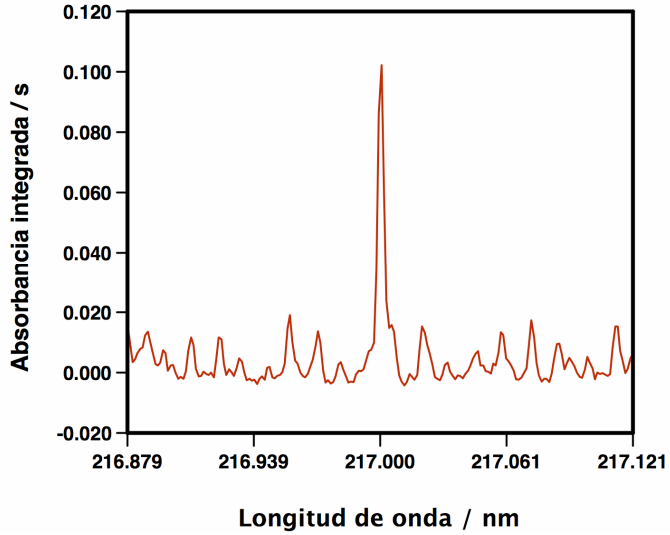
Probablemente lo primero que llama la atención al empezar a trabajar con un instrumento de *GF-AAS* de fuente continua de alta resolución es que, al proporcionar gráficas tridimensionales absorbancia-longitud de onda-tiempo, permite ver realmente los procesos que se producen en el entorno de la longitud de onda de absorción a lo largo del tiempo. El conocimiento preciso de las longitudes de onda y del tiempo al que aparece la absorción de otros elementos o una señal estructurada puede facilitar la toma de decisiones para eliminar o minimizar su influencia.

Las primeras medidas realizadas para el plomo en los *DBS* con el nuevo instrumento, en las mismas condiciones utilizadas con el de fuente de línea (Tabla II.3) resultaron satisfactorias por lo que no se hizo ningún intento adicional de mejorar el método (con respecto a la naturaleza y cantidad del modificante químico o al programa de temperaturas) y, únicamente por motivos de investigación, el tiempo de integración se extendió de 2 a 5 segundos para observar con más detalle los espectros de las señales y analizar cualquier posible interferencia.

Señal en la línea de 217.001 nm.

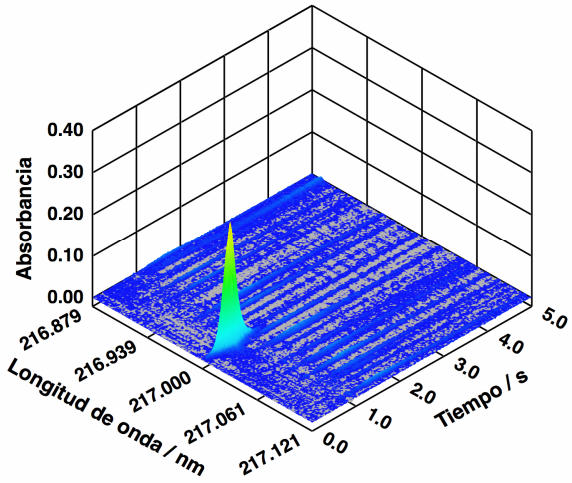
La Figura III.3.2 muestra la señal bidireccional absorbancia-longitud de onda obtenida para una muestra de 150 µg Pb L^{-1} en un *DBS*. Puede observarse que, además de la señal del plomo, aparece una absorción correspondiente a una señal estructurada, aunque la utilización de únicamente 3 píxeles para la integración de la señal del plomo evita que se produzcan solapamientos de la misma con este fondo.

Figura III.3.2. Señal absorbancia-longitud de onda del plomo en un *DBS* para la región espectral centrada en 217.001 nm.



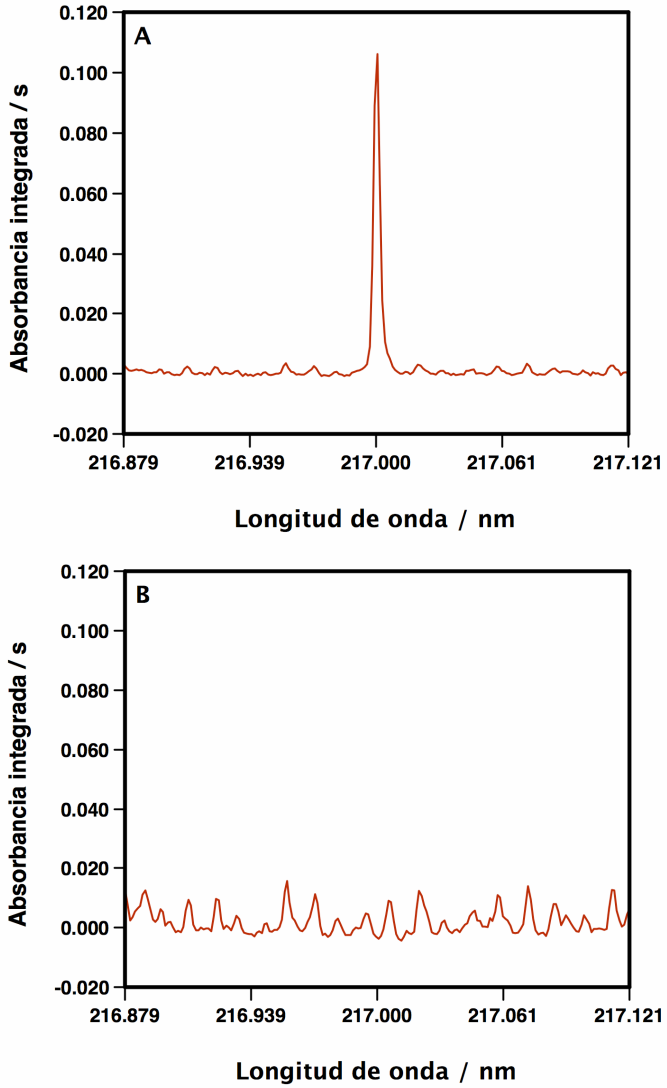
Pero además, la Figura III.3.3 en la que se presenta la señal tridimensional indica que dicha absorción estructurada aparece retrasada en el tiempo respecto de la absorción del plomo y, por tanto, optimizando el tiempo de integración puede eliminarse casi por completo.

Figura III.3.3. Señal absorbancia-longitud de onda-tiempo del plomo en un *DBS* para la región espectral centrada en 217.001 nm.



Esto se demuestra en la Figura III.3.4 en la que aparece integrada la misma señal anterior pero considerando únicamente los 1.25 segundos iniciales (A) o bien entre los segundos 1.25 y 5 (B).

Figura III.3.4. Señal absorbancia-longitud de onda del plomo en un *DBS* para la región espectral centrada en 217.001 nm con distintos tiempos de integración.

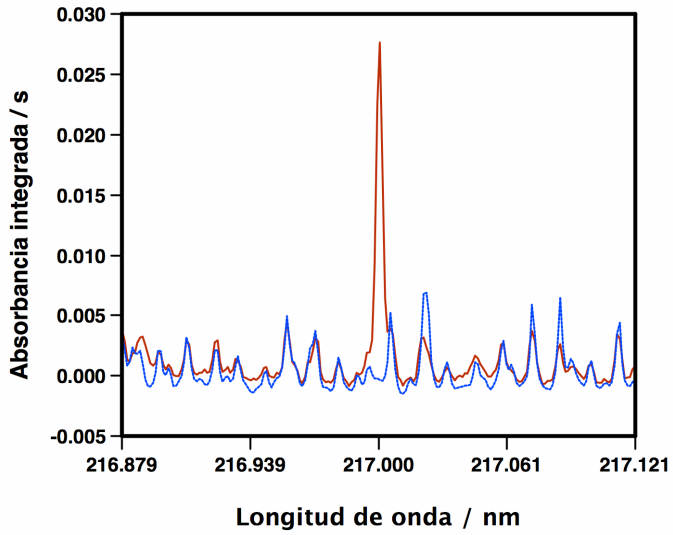


A) Integración de los 1.25 segundos iniciales; B) Integración entre los segundos 1.25 y 5.

Como en las muestras reales de plomo en los *DBS* la absorbancia sólo se registró durante dos segundos, la incidencia de esta posible interferencia es mínima con el equipo de fuente continua, aunque se tomen más píxeles alrededor del central para la evaluación de la absorbancia del plomo. Asimismo justifica los buenos resultados obtenidos con la corrección de la señal de fondo mediante lámpara de deuterio en el equipo de fuente de línea, lo que no sería posible si una absorción estructurada de este tipo se solapase con la señal analítica.

Borges *et al*. tratando la determinación de plomo en muestras biológicas [16], identificaron esta señal estructurada como producida por la molécula PO. Para confirmarlo, se introdujo en el horno de grafito una solución de $(NH_4)_2HPO_4$ y se sometió al programa de temperaturas con un tiempo de integración de cinco segundos. Como puede observarse en la Figura III.3.5, la señal obtenida concuerda perfectamente con la absorción estructurada que aparece cuando se analizan discos de *DBS*.

Figura III.3.5. Señales obtenidas para un *DBS* de 48 µg de Pb L^{-1} (línea roja) y para una disolución acuosa al 0.1% de $(NH_4)_2HPO_4$ (línea azul).

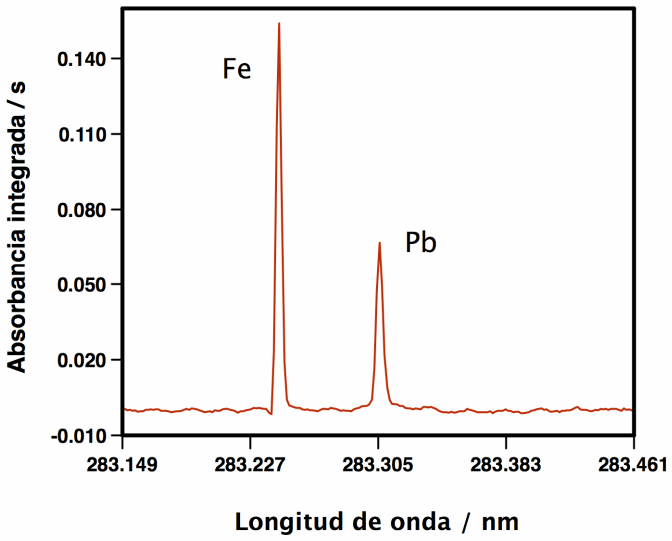


Aunque el software del instrumento permite sustraer este fondo de la señal analítica mediante un algoritmo de mínimos cuadrados, no se consideró necesario ya que no tiene una incidencia real en la calidad de los resultados analíticos.

Señal en la línea de 283.306 nm.

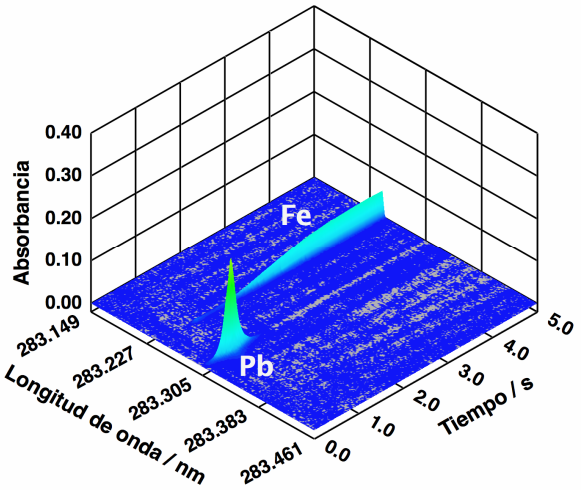
La Figura III.3.6 presenta el espectro obtenido para la misma muestra de la Figura III.3.2 (*DBS* de 150 µg de Pb L^{-1}), pero centrando el detector a 283.306 nm. Se aprecia una línea estrecha y de gran intensidad a 283.245 nm, atribuida al hierro. Puesto que está suficientemente alejada de la línea atómica del plomo, no es de esperar que se produzcan interferencias con ninguno de los sistemas de medida.

Figura III.3.6. Señal absorbancia-longitud de onda del plomo en un *DBS* para la región espectral centrada en 283.306 nm.



Además, como se puede ver en la Figura III.3.7, la línea del hierro aparece retardada con respecto al pico del plomo, por lo que podría eliminarse casi por completo si se redujera el tiempo de integración.

Figura III.3.7. Señal absorbancia-longitud de onda-tiempo del plomo en un *DBS* para la región espectral centrada en 283.306 nm.



III.3.2. Extensión del rango lineal para la determinación de plomo en sangre.

Es bien conocido que la técnica de *GF-AAS* tiene un rango dinámico lineal reducido, en torno a un orden de magnitud, lo que hace que se pierda la linealidad entre señal y concentración cuando ésta es del orden de 10-20 veces mayor que el límite de cuantificación.

Generalmente esto no supone ninguna dificultad cuando se desea medir concentraciones elevadas en muestras disueltas pues bastar realizar una dilución de las mismas aunque, en el caso de medidas de plomo en sangre líquida, dicha dilución puede introducir algún sesgo como consecuencia de la modificación de la matriz [17].

Sin embargo, cuando se pretende realizar una determinación directa sobre una muestra sólida (por ejemplo, la sangre depositada en un papel de filtro) la situación es mucho más problemática, pues la muestra no se puede diluir. En estas circunstancias, para medir concentraciones elevadas, hay que modificar las condiciones de trabajo. Lo más frecuente es utilizar líneas menos sensibles, si se dispone de ellas, y mantener el flujo de argón durante la atomización [18]. También se ha descrito para esta finalidad la utilización de la corrección de absorción inespecífica basada en el efecto Zeeman, funcionando en modo de tres campos [19].

Ahora bien, estas condiciones de trabajo modificadas para altas concentraciones del analito no sirven para la medida de las concentraciones habituales del mismo por lo que casos, afortunadamente excepcionales, en los que sólo se pueda realizar una medida por muestra resultan especialmente problemáticos, ya que no se conoce *a priori* las condiciones que deben utilizarse [20].

La *GF-AAS* con fuente continua puede proporcionar una solución muy elegante a este problema. Como se ha indicado en la introducción de este apartado, en esta instrumentación cada píxel del detector *CDC* amplifica la absorción atómica en aproximadamente 1 pm alrededor de la longitud de onda seleccionada [13,21]. La resolución real del instrumento depende de la longitud de onda de trabajo y para la línea atómica del plomo de 217.001 nm, el

intervalo de longitudes de onda cubierto por cada uno de los 200 píxeles del detector es aproximadamente 1.2 pm, mientras que para la línea de 283.306 nm es aproximadamente 1.6 pm.

Dado que la instrumentación proporciona la absorbancia o la absorbancia integrada de cada uno de los píxeles y que estas medidas son aditivas, el operador puede decidir, después de realizar la medida, el número y la posición de los píxeles que utiliza. Obviamente, cuanto mayor sea este número, mayor será la sensibilidad y menor la masa característica pero la inclusión de píxeles alejados del máximo sólo mejorarán moderadamente la sensibilidad a costa de elevar el ruido de fondo [22]. Se ha señalado que los mejores límites de detección se consiguen normalmente utilizando sólo 3 píxeles (el central más los adyacentes, a izquierda y derecha) [23].

Pues bien, esta característica instrumental de la *GF-AAS* con fuente continua hace que, tras la medida de una única serie de patrones en las condiciones habituales de trabajo, el operador pueda disponer de varias curvas de calibrado de diferente sensibilidad (y normalmente de distinto rango lineal) sin más que seleccionar un número mayor o menor de píxeles en distintas posiciones.

Para las medidas de absorción atómica del plomo en sangre en los *DBS*, el instrumento de fuente continua proporciona mejor sensibilidad que el de fuente de línea. En este caso, como se comentó en el Apartado III.1, la pendiente de la curva de calibrado para la línea más sensible de 217.001 nm varió entre 0.00092 y 0.00101 s L μg^{-1}, mientras que con el instrumento de fuente continua trabajando en la forma que se considera óptima (suma de los tres píxeles centrales) estos valores oscilaron entre 0.00143 y 0.00152 s L μg^{-1}.

La relación entre la sensibilidad de las líneas de 217.001 y 283.306 se mantiene, con esta última un 30-35% inferior a la primera. La sensibilidad de la línea de 283.306 nm midiendo con el instrumento de fuente continua es muy similar a la obtenida con el equipo de fuente de línea para la línea 217.001 nm.

Esta mejora de la sensibilidad lleva aparejada una pérdida en el rango lineal. Trabajando en condiciones de máxima sensibilidad con el instrumento de fuente de línea se alcanzaban los 442 µg de Pb L^{-1}, mientras que con el de fuente continua este límite se redujo a aproximadamente 240 µg de Pb L^{-1}.

Ahora bien, como se ha indicado anteriormente, el instrumento de fuente continua ofrece otras posibilidades. En la Figura III.3.8 se muestra el perfil de absorción de la línea atómica del plomo de 217.001 nm con separación de los diferentes píxeles que pueden medirse y en la Tabla III.3.1 se presentan los valores característicos que puede conseguirse con diversas combinaciones de píxeles.

Figura III.3.8. Perfil de la línea de absorción atómica del plomo a 217.001 nm.

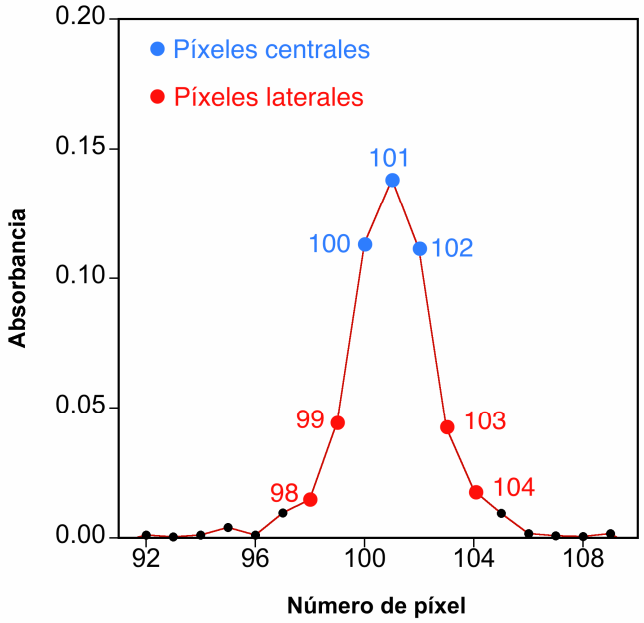


Tabla III.3.1. Sensibilidad y rango lineal para las medidas de plomo en sangre en los *DBS* en la línea de 217.001 nm con distintas combinaciones de píxeles.

Píxeles monitorizados	Linealidad/ µg Pb L^{-1}	R^2	Sensibilidad/ s L μg^{-1}	m_o/ pg	*LOD*/ µg L^{-1}
101	hasta 239	0.998	$6.32\ 10^{-4}$	64.5	1.8
100 + 101 + 102	hasta 239	0.998	$15.1\ \ 10^{-4}$	26.6	1.0
99 + 100 + 101 + 102 + 103	hasta 239	0.998	$18.6\ \ 10^{-4}$	21.6	1.1
99 + 103	hasta 442	0.999	$3.26\ 10^{-4}$	114.3	4.6
98 + 104	hasta 837	0.995	$1.16\ 10^{-4}$	267.1	13.0

Estos resultados están en concordancia con los de otros trabajos anteriores [21,22]. El mejor límite de detección se obtiene utilizando los tres píxeles centrales, aunque si se usan los cinco centrales el valor es muy parecido y la masa característica es ligeramente inferior. En cuanto al objeto de este estudio, puede observarse que la sensibilidad que se obtiene trabajando con los tres píxeles centrales disminuye de forma importante cuando se prescinde de los mismos: en un factor de 4.6 con los píxeles 99+103 y en un factor de 13 con los píxeles 98+104. Consecuentemente, el rango lineal se amplia hasta 442 µg de Pb L^{-1} y 837 µg de Pb L^{-1} respectivamente.

Si se comparan estos resultados con los obtenidos con el instrumento con fuente de línea, en este caso para alcanzar una concentración de hasta 837 µg de Pb L^{-1} era necesario mantener el flujo de argón en la etapa de atomización, es decir, modificar las condiciones de medida. Utilizando un instrumento de fuente continua se pueden realizar las medidas siempre en condiciones de máxima sensibilidad (mejor que la obtenida con fuente de línea) y si el contenido de alguna muestra supera el rango lineal de estas condiciones de trabajo, basta con utilizar *a posteriori* una combinación diferente de píxeles. En concreto, el uso de los píxeles 98+104 permite alcanzar las mismas concentraciones que con el instrumento de fuente de línea trabajando sin detener el flujo de argón en la etapa de atomización.

III.3.3. Uso de un patrón interno para las medidas de níquel en orina y sangre.

La capacidad de la *GF-AAS* con fuente continua para medir simultáneamente dos elementos abre la posibilidad de utilizar un patrón interno en las medidas, estrategia que permite compensar posibles variaciones durante el proceso de medida y que es de amplia utilización en otras técnicas analíticas como las basadas en el *ICP*. En los últimos años se han investigado sus posibilidades para la *AAS* de fuente continua con atomización en llama utilizando el procedimiento multielemental secuencial citado anteriormente [24-27].

Como se deduce de las características multielementales del ContrAA 700, el uso de un patrón interno en las determinaciones mediante *GF-AAS* resulta mucho menos sencillo, aunque es preciso citar que existen trabajos en este campo realizados con un espectrómetro SIMAA 6000 (de *Perkin-Elmer*, que lo dejó de comercializar la pasada década) que estaba diseñado para combinar y detectar la radiación originada desde hasta cuatro lámparas diferentes de cátodo hueco, de forma que los elementos podían ser medidos al mismo tiempo [28-33].

Para utilizar un elemento como patrón interno en *GF-AAS* con fuente continua es necesario medir su absorción atómica de forma simultánea a la del analito para lo que, como se ha expuesto anteriormente, ambos elementos deben tener líneas atómicas muy próximas. Este requisito, que limita notablemente las capacidades multielementales de la técnica, resulta menos grave a la hora de utilizar un patrón interno ya que éste lo elige el propio analista. Hay varios elementos que tienen cientos de líneas atómicas (por ejemplo, hierro, cobalto, cromo, níquel,…) y no resulta demasiado complicado encontrar alguna en la proximidad de la zona analítica de interés.

Además, de forma general, la utilización de un patrón interno debe cumplir varios requisitos: a) no debe estar presente en niveles significativos en la muestra o, en caso de estarlo, su contenido debe ser conocido de antemano; b) la relación entre las señales del patrón interno y del analito debe ser cercana a la unidad; c) su comportamiento ante el sistema de medida debe ser lo más parecido posible al del analito.

Este último requisito es particularmente importante en el caso de las determinaciones por *GF-AAS* debido a que si los elementos no tienen volatilidades similares en el horno de grafito, serán vaporizados y atomizados en momentos diferentes, con lo que posibles perturbaciones a lo largo del proceso les afectarán de forma distinta, tal como demuestran algunos trabajos realizados con el instrumento SIMAA 6000 citado anteriormente [28,30,31].

Para comprobar la importancia de la atomización simultánea del analito y del patrón interno se estudiaron dos situaciones distintas: la medida de plata utilizando níquel como patrón interno y la de níquel con cobalto como dicho patrón. En ambos casos existe una línea atómica del patrón interno suficientemente cercana a la del analito y se prepararon disoluciones que contenían cantidades de los distintos elementos suficientes para proporcionar buenas señales (absorbancia integrada en el rango de 0.3-0.5 s) y con una relación señal del analito/señal del patrón interno próxima a la unidad. En las Figuras III.3.9 y III.3.10 se muestran las señales obtenidas para esta mezclas.

Figura III.3.9. Señal absorbancia-longitud de onda-tiempo de una disolución de níquel y plata para la región espectral centrada en 338.180 nm.

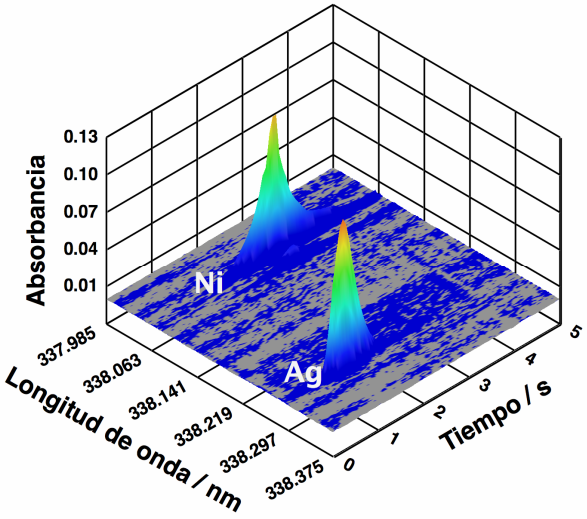
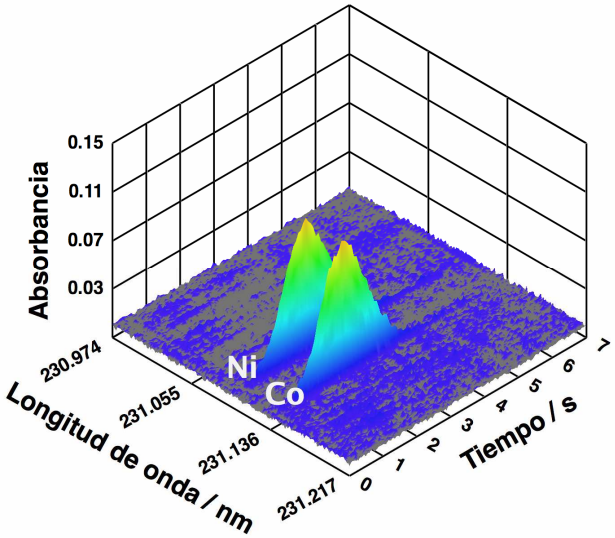


Figura III.3.10. Señal absorbancia-longitud de onda-tiempo de una disolución de níquel y cobalto para la región espectral centrada en 231.096 nm.



Puede observarse que la atomización del níquel y del cobalto es prácticamente simultánea, mientras que la de la plata y el níquel es claramente distinta y, por lo tanto, en este último caso existe el riesgo de que las variaciones que pueden producirse durante los procesos de vaporización y atomización afecten a estos elementos de una manera diferente.

En la Tabla III.3.2 se presentan los valores de DSR de la señal obtenida para ambos analitos al realizar quince medidas consecutivas de los mismos y la incidencia que sobre los mismos tiene el uso del patrón interno.

Tabla III.3.2. Influencia del patrón interno en la precisión de las medidas de disoluciones de plata y níquel por *GF-AAS* de fuente continua.

Analito (línea)	Patrón interno (línea)	Volumen inyectado	DSR (sin patrón interno)	DSR (con patrón interno)	r [1]	F [2]
40 µg Ag L^{-1} (338.289 nm)	4000 µg Ni L^{-1} (338.057 nm)	10 µL	1.7%	2.1%	0.0885	1.53
100 µg Ni L^{-1} (231.096 nm)	40000 µg Co L^{-1} (231.136 nm)	10 µL	1.7%	0.8%	0.9469	4.52
200 µg Ag L^{-1} (338.289 nm)	2000 µg Ni L^{-1} (338.057 nm)	2 µL	7.5%	3.1%	0.9390	5.85
500 µg Ni L^{-1} (231.096 nm)	200000 µg Co L^{-1} (231.136 nm)	2 µL	7.3%	3.3%	0.9638	4.89

[1] Coeficiente de correlación entre la señal del analito y la del estándar interno.
[2] Valor crítico para el test F = 2.47.

Cuando las medidas se realizan en condiciones normales de trabajo, con inyección de al menos 10 µL de muestra en la cámara de grafito, la precisión obtenida para ambos analitos sin utilizar el patrón interno es muy buena, con DSR=1.7% tanto para la plata como para el níquel. Obviamente es difícil mejorar tales valores pero el uso del cobalto como patrón interno del níquel, que *a priori* reúne los requisitos ideales para ello, logra reducir la DSR de éste por debajo del 1%, diferencia que es estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95%.

Por el contrario, los resultados confirman las malas expectativas de utilizar el níquel como patrón interno de la plata ya que con el mismo, la DSR de las medidas de plata, no sólo no disminuye, sino que se incrementa ligeramente aunque la diferencia no es estadísticamente significativa con un nivel de confianza del 95%. Al no producirse simultáneamente los procesos de vaporización y atomización del analito y del patrón interno las variaciones que ocurren durante los mismos les afectan de forma diferente y, como consecuencia, la incertidumbre final de la medida tiene dos contribuciones en lugar de sólo una.

Sin embargo, incluso en estas condiciones desfavorables, el uso de un patrón interno puede ser beneficioso en algunas situaciones concretas en las que la principal fuente de imprecisión le afecte de forma similar que al analito. Por ejemplo, si debido a una escasa disponibilidad de muestra es necesario trabajar con volúmenes muy pequeños, es previsible que la variabilidad del volumen depositado en el atomizador sea la principal contribución a la DSR de las medidas. En efecto, como puede verse en la Tabla III.3.2, cuando se inyectan en el horno de grafito 2 µL (mínimo volumen que permite dispensar el muestreador acoplado al instrumento utilizado) de las mismas disoluciones, la DSR de las medidas, sin utilizar patrón interno, se elevan por encima del 7% para ambos analitos.

El uso de un patrón interno debería mejorar esta situación ya que las variaciones en la medida del volumen inyectado afectan por igual a todos los elementos de la disolución. En efecto, como se indica en la Tabla III.3.2, utilizando un patrón interno los valores de DSR disminuyen a valores ligeramente superiores al 3%, no solo en la medida del níquel que tiene en el cobalto un patrón interno ideal, sino también en la de la plata pese a lo poco adecuado que es el níquel como patrón interno para este analito.

Aunque la situación anteriormente descrita pueda considerarse artificiosa, sus conclusiones pueden resultar de interés en el análisis de algunas muestras biológicas que presenten una

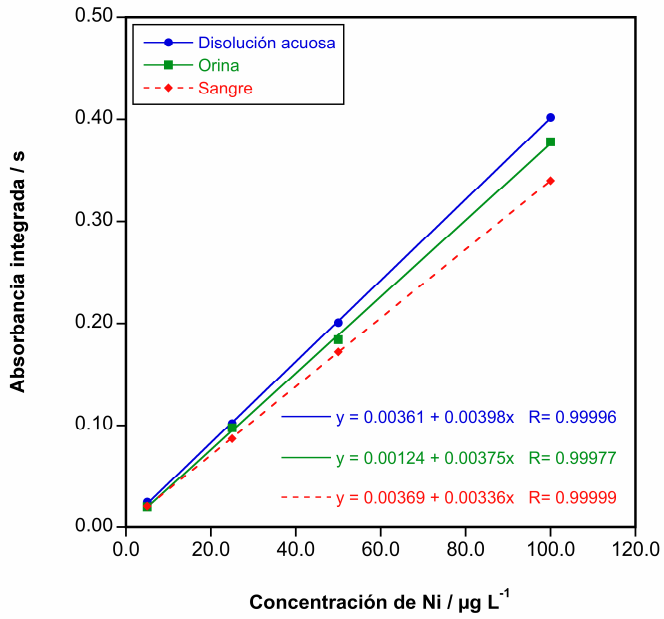
viscosidad apreciable, pues en ellas la variabilidad del volumen tomado por el muestreador automático tiene una influencia considerable en la precisión de los resultados obtenidos.

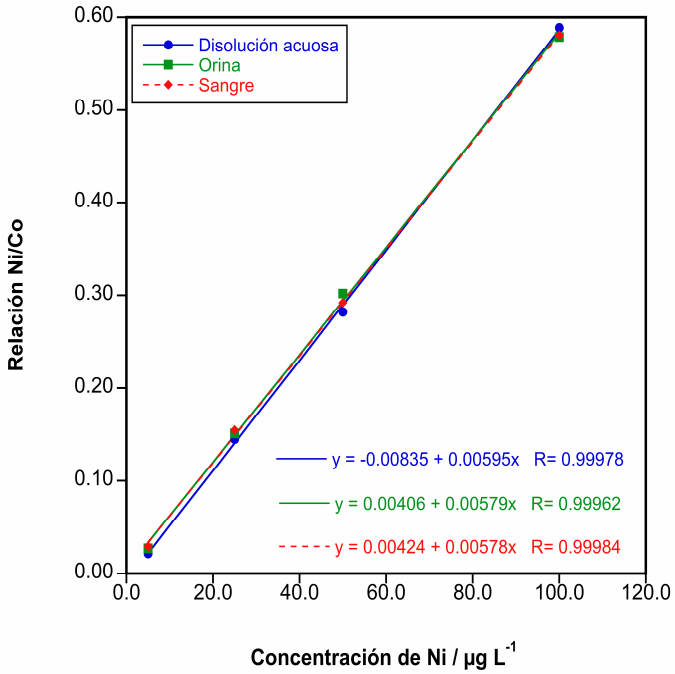
Además de las posibles mejoras en la precisión, la utilidad más importante de un patrón interno es la corrección de posibles efectos de matriz, de forma que resulte más fácil el desarrollo de procedimientos de calibrado cuando se analizan muestras complejas y a este tema se dedicaron la mayoría de los trabajos desarrollados con el SIMAA 6000 que se han citado anteriormente.

En este sentido se estudió la utilidad del cobalto como patrón interno en la determinación de níquel en muestras biológicas reales como sangre y orina, en las que no es infrecuente observar efectos de matriz. Para ello se diluyeron con agua mili-Q una muestra real de sangre (dilución 1:3) y otra de orina (dilución 1:1) exentas de níquel y cobalto (por debajo del límite de detección de ambos elementos por *GF-AAS*) y alícuotas de las mismas se fortificaron con cantidades variables de níquel y una cantidad fija de cobalto para obtener una concentración final de 40 mg de Co L^{-1}. Asimismo se prepararon disoluciones acuosas de níquel de distinta concentración a las que se adicionó la misma cantidad de cobalto que a las muestras reales.

En la Figura III.3.11 se presentan las curvas de calibrado obtenidas para el níquel por medida directa del mismo y mediante el uso del patrón interno.

Figura III.3.11. Curvas de calibrado del níquel a 231.096 nm en distintas matrices.

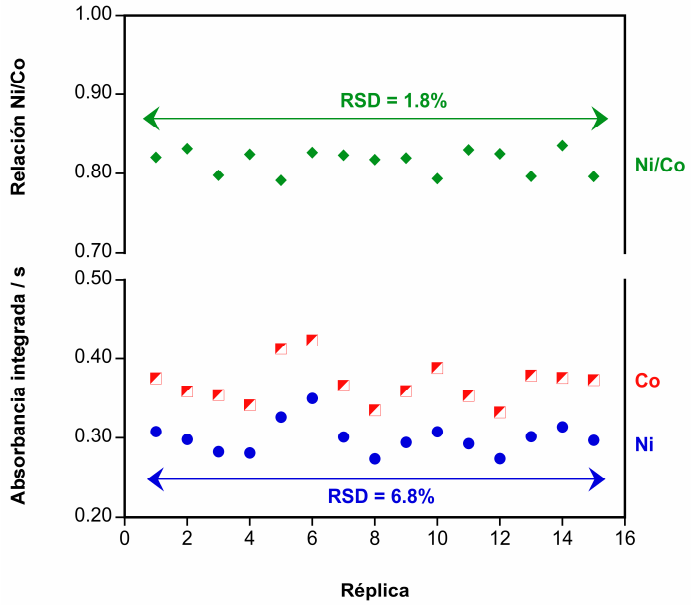




Puede apreciarse que si se mide directamente la absorción atómica del níquel parecen producirse efectos de matriz tanto para la orina como para la sangre, en este último caso de forma notoria pues la pendiente de la curva de calibrado es casi un 20% inferior a la que se obtiene con los patrones acuosos. El uso del cobalto como patrón interno permite resolver fácilmente esta dificultad pues, como puede observarse en la Figura III.3.11, las pendientes de las curvas de calibrado obtenidas con disoluciones acuosas y con las otras dos matrices son prácticamente idénticas, con una diferencia menor del 3% entre ellas y ello a pesar de la naturaleza altamente viscosa de la sangre.

Finalmente se comprobó si el uso del cobalto como patrón interno mejoraba la precisión de las medidas del níquel en muestras reales. Para ello se realizaron quince medidas consecutivas de 10 µL de las disoluciones de sangre y orina diluidas preparadas anteriormente que contienen 100 µg L^{-1} de níquel. Los valores de DSR obtenidos por medida directa de la absorción atómica del níquel fueron de 8.4% para la sangre y de 6.8% para la orina, pero estos valores se reducen hasta 2.9% y el 1.8% respectivamente si se utiliza el cobalto como patrón interno lo que no es extraño si se tiene en cuenta la correlación encontrada entre las señales de níquel y de cobalto (r = 0.961 para la orina y r = 0.947 para la sangre). Este comportamiento aparece ilustrado para el caso de la orina en la Figura III.3.12, donde se muestran los valores individuales de dichas medidas así como la relación señal de níquel/señal de cobalto.

Figura III.3.12. Influencia del cobalto como patrón interno en la precisión en las medidas de níquel en orina por *GF-AAS*.



III.3.4. Conclusiones.

Se han evaluado algunas de las potenciales ventajas de la moderna técnica de *GF-AAS* de alta resolución con fuente continua aplicadas a los fluidos biológicos objeto de esta Tesis.

Estudiando la señal generada por el plomo en sangre, se concluye que la nueva instrumentación ofrece unas posibilidades mucho mayores que la *GF-AAS* convencional para la corrección de la absorción inespecífica y de las interferencias espectrales, lo que resulta especialmente importante en las determinaciones directas sobre muestras sólidas, ya que la alícuota de medida contiene la matriz intacta. Las mejoras en la corrección devienen tanto de un mejor conocimiento del entorno de la longitud de onda en el que se produce la absorción (lo que permite regular de forma más precisa las condiciones de atomización), como de la existencia de un algoritmo de corrección en el *software* del instrumento.

La técnica de *GF-AAS* de alta resolución con fuente continua permite elegir el número y la posición de los píxeles que se utilizan para cuantificar la señal, lo que proporciona una nueva forma de regular la sensibilidad y de modificar el rango lineal. Esta característica resulta de gran interés en las determinaciones directas sobre muestras sólidas cuando el contenido del analito en las mismas es elevado, pues la solución trivial de diluir la muestra no se puede utilizar en este caso. Para la determinación del plomo en sangre, y sin recurrir a soluciones extremas, la elección de píxeles permite extender cuatro veces el rango de trabajo convencional sin cambiar las condiciones de trabajo y sin un deterioro apreciable de la precisión.

La capacidad de la técnica de *GF-AAS* de alta resolución con fuente continua para medir simultáneamente la absorción de más de una línea atómica permite el uso de un patrón interno para realizar las determinaciones. Se ha comprobado que la utilización de cobalto como patrón interno en la determinación de níquel en orina permite disminuir la DSR a aproximadamente la mitad.

Como se deduce de lo anterior, esta técnica debe permitir la determinación simultánea de más de un elemento, lo que será estudiado en el siguiente apartado de esta Memoria.

III.3.5. Bibliografía

[1] B. Welz, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann. High-Resolution Continuum Source AAS: the Better Way to Do Atomic Absorption Spectrometry. Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2005.

[2] P.N. Keliher, C.C. Wohlers. High resolution atomic absorption spectrometry using an echelle grating monochromator. *Anal. Chem.*, 1974, 46, 682–687.

[3] J.M. Harnly, T.C. O'Haver, B. Golden, W.R. Wolf. Background-corrected simultaneous multielement atomic absorption spectrometer. *Anal. Chem.*, 1979, 51, 2007–2014.

[4] J.M. Harnly. Multielement atomic absorption with a continuum source. *Anal. Chem.*, 1986, 58, 933A–943A.

[5] J.M. Harnly. R.E. Fields. Solid-state array detectors for analytical spectrometry. *Appl Spectrosc.*, 1997, 51, A334–A351.

[6] J.M. Harnly. The future of atomic absorption spectrometry: a continuum source with a charge coupled array detector? *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, 14, 137–146.

[7] K.P. Schmidt, H. Becker-Ross, S. Florek. A combination of a pulsed continuum light source, a high resolution spectrometer, and a charge coupled device detector for multielement atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, 1990, 45, 1203–1210.

[8] H. Becker-Ross, S. Florek, R. Tischendorf, G.R. Schmecher. Flashlamp continuum AAS: time resolved spectra. *J. Anal. At. Spectrom.*, 1995, 10, 61–64.

[9] S. Florek, H. Becker-Ross. High-resolution spectrometer for atomic spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 10 (1995) 145–331.

[10] S. Florek, H. Becker-Ross. Adaptation of an echelle spectrograph to a large CCD detector. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 1996, 355, 269–271.

[11] H. Becker-Ross, S.V. Florek. Echelle spectrometers and charge-coupled devices. *Spectrochim. Acta Part B*, 1997, 52, 1367–1375.

[12] U. Heitmann, M. Schutz, H. Becker-Ross, S. Florek. Measurements on the Zeeman-splitting of analytical lines by means of a continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometer with a linear charge coupled device array. *Spectrochim. Acta Part B*, 1996, 51, 1095–1105.

[13] M. Resano, E. García-Ruiz. High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry: is it as good as it sounds? A critical review. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 399, 323–330.

[14] B. Welz, S. Morés, E. Carasek, M.G.R. Vale, M. Okruss, H. Becker-Ross. High-Resolution Continuum Source Atomic and Molecular Absorption Spectrometry—A Review. *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2010, 45, 327–354.

[15] J. del Rio, J. Beguiristain, J. Duart. Metal levels in corrosion of spinal implants. *Eur. Spine J.*, 2007, 16, 1055–1061.

[16] D.L.G. Borges, A.F. da Silva, B. Welz, A.J. Curtius, U. Heitmann. Determination of lead in biological samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with direct solid sampling. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, 21, 763–769.

[17] N. Campillo, P. Viñas, I. López-García, M. Hernández-Córdoba. Rapid determination of lead and cadmium in biological fluids by electrothermal atomic absorption spectrometry using Zeeman correction. *Anal. Chim. Acta*, 1999, 390, 207–215.

[18] M.A. Belarra, M. Resano, F. Vanhaecke, L. Moens. Direct solid sampling with electrothermal vaporization/atomization: what for and how? *Trends Anal. Chem.*, 2002, 21, 828–839.

[19] M. Resano, M. Aramendía, E. García-Ruiz, C. Crespo, M.A. Belarra. Solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for the direct determination of silver at trace and ultratrace levels. *Anal. Chim. Acta*, 2006, 571, 142–149.

[20] J. Briceño, M.A. Belarra, K.A.C. De Schamphelaere, S. Vanblaere, C.R. Janssen, F. Vanhaecke, M. Resano. Direct determination of Zn in individual Daphnia magna specimens by means of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2010, 25, 503–510.

[21] B. Welz, D.L.G. Borges, F.G. Lepri, M.G.R. Vale, U. Heitmann. High-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry — An analytical and diagnostic tool for trace analysis. *Spectrochim. Acta Part B*, 2007, 62, 873–883.

[22] M. Resano, M.R. Flórez. Direct determination of sulfur in solid samples by means of high-resolution continuum source graphite furnace molecular absorption spectrometry using palladium nanoparticles as chemical modifier. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2012, 27, 401–412.

[23] U. Heitmann, B. Welz, D.L.G. Borges, F.G. Lepri. Feasibility of peak volume, side pixel and multiple peak registration in high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, 2007, 62, 1222–1230.

[24] H.-D. Projahn, U. Steeg, J. Sanders, E. Vanclay. Application of the reference-element technique for fast sequential flame atomic-absorption spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, 378, 1083–1087.

[25] J.L. Raposo Jr., S.R. Oliveira, J.A. Nóbrega, J.A.G. Neto. Internal standardization and least-squares background correction in high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry to eliminate interferences on determination of Pb in phosphoric acid. *Spectrochim. Acta Part B*, 2008, 63 992–995.

[26] S.L.C. Ferreira, A.S. Souza, G.C. Brandao, H.S. Ferreira, W.N.L. dos Santos, M.F. Pimentel, M.G.R. Vale. Direct determination of iron and manganese in wine using the reference element technique and fast sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 2008,74, 699–702.

[27] K. Miranda, A.G.G. Dionísio, E.R. Pereira-Filho. Copper determination in sugar cane spirits by fast sequential flame atomic absorption spectrometry using internal standardization. *Microchem. J.*, 2010, 96, 99–101.

[28] B. Radziuk, N.P. Romanova, Y. Thomassen. Evaluation of internal standardisation in electrothermal atomic absorption spectrometry. *Anal. Commun.*, 1999, 36, 13–16.

[29] A.P. Oliveira, J.A.G. Neto, J.A. Nóbrega, P.V. Oliveira. Use of the internal standardization for difficult sampling by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 2004, 64, 334–337.

[30] P.R.M. Correia, P.V. Oliveira, J.A.G. Neto, J.A. Nóbrega. Silver as internal standard for simultaneous determination of Cd and Pb in whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19, 917–922.

[31] P.R.M. Correia, P.V. Oliveira. Cobalt as internal standard for arsenic and selenium determination in urine by simultaneous atomic absorption spectrometry. *Talanta*, 2005, 67, 46–53.

[32] S.R. de Oliveira, J.A.G. Neto. Evaluation of Bi as internal standard to minimize matrix effects on the direct determination of Pb in vinegar by graphite furnace atomic absorption spectrometry using Ru permanent modifier with co-injection of Pd/$Mg(NO_3)_2$. *Spectrochim. Acta Part B*, 2007, 62, 1046–1050.

[33] N.M. Caldas, S.R. Oliveira, J.A. Gomes Neto. Feasibility of internal standardization in the direct and simultaneous determination of As, Cu and Pb in sugar-cane spirits by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Anal. Chim. Acta*, 2009, 636, 1–5.

III.4. Determinación directa y simultánea de molibdeno y titanio en orina en los DUS mediante *GF-AAS* con fuente continua.

El molibdeno y el titanio son dos elementos que han recibido muy poca atención en el ámbito del análisis clínico debido a que se han considerado carentes de interés para la salud.

Así, en el caso del titanio, dado que no se conoce ningún papel biológico del mismo en los seres humanos, tradicionalmente se le ha considerado como un elemento *biológicamente inerte* y, por lo tanto, ideal para utilizarlo en implantes metálicos, tales como prótesis dentales u ortopédicas como articulaciones, cadera o vertebras, por citar algunos ejemplos [1]. En consecuencia, hasta hace pocos años, la determinación de titanio en fluidos biológicos no ha pasado de ser un tema puramente académico ya que su medida no ofrecía ninguna información clínica de interés.

A diferencia del titanio, el molibdeno es un elemento traza esencial para animales, plantas y microorganismos aunque, en los animales, la única función conocida del molibdeno es formar parte de un complejo denominado *cofactor de molibdeno*, indispensable para el funcionamiento de tres enzimas: xantina oxidasa, aldehído oxidasa y sulfito oxidasa [2]. Debido al contenido relativamente elevado de este elemento en los alimentos, no se han reseñado casos bien definidos de deficiencia dietética del mismo en humanos, excepto aquéllos que resultan de defectos moleculares del *cofactor de molibdeno* [3].

Por otra parte, hasta la fecha, el molibdeno se ha considerado relativamente no tóxico para humanos, aunque los pacientes con intoxicación *aguda* de este elemento presentan síntomas similares a los que produce la deficiencia de cobre o un metabolismo del azufre alterado [4]. Esta doble situación de no apreciarse normalmente deficiencias ni excesos de molibdeno que resulten perjudiciales para la salud ha hecho que este elemento, como el titanio, no haya sido investigado normalmente en muestras biológicas.

Esta situación ha cambiado como consecuencia del uso de implantes metálicos en cirugía orto-protésica, ya que las concentraciones de determinados metales en sangre y/o orina han pasado a considerarse como indicadores potenciales de la funcionalidad del implante. Con este propósito se han determinado varios elementos (fundamentalmente cromo, cobalto, molibdeno y titanio) en diversas muestras corporales, principalmente suero y orina, pero también en sangre total, hematíes y líquido sinovial [5].

En efecto, diferentes investigaciones han demostrado que, tras la colocación de un implante, se produce un aumento moderado de la concentración de estos elementos en los diferentes especímenes analizados, pero transcurrido cierto tiempo se alcanza una nivel estable de los mismos cuando la prótesis funciona correctamente [6-9].

Aunque el control del correcto funcionamiento de las prótesis sea interesante, lo que realmente ha impulsado el interés por la medida de los elementos citados ha sido la aparición de casos en los que se demostró un notable incremento de las concentraciones de estos elementos en pacientes con prótesis que funcionaban mal, incluyendo situaciones en las que no pudo visualizarse el fallo (desgaste anómalo, corrosión o desplazamiento del implante) por métodos de diagnóstico por imagen, a pesar del dolor padecido por el paciente [6,10-12]. Rizzetti *et al*. [13] han descrito un caso extremo en el que una paciente sufrió una severa intoxicación que le causó ceguera y sordera, entre otros síntomas neurológicos, debido a la liberación masiva de metales desde una prótesis de cadera fallida.

Pese a que la opinión más extendida es que la mayoría de pacientes con implantes tienen un riesgo muy bajo de que estos les generen problemas serios de salud, en el Reino Unido los

estudios anteriores han provocado una alerta oficial de la *Medicines and Healthcare products Regulatory Agency* (MHRA), en la que se sugiere que deberían medirse los niveles de iones metálicos en los pacientes con prótesis de cadera del tipo *metal sobre metal* (*metal on metal*, *MoM*) si muestran características que los sitúen en riesgo de una reacción adversa o de dolor [14].

Puesto que el cuerpo humano elimina estos elementos por vía renal [15,16], su concentración en la orina parece la prueba más adecuada para realizar este diagnóstico. Además, para el paciente, es mucho más cómodo obtener una muestra de orina que de sangre.

En pocos estudios epidemiológicos generales se han proporcionado concentraciones urinarias para el molibdeno y menos aún para el titanio posiblemente debido a que sus niveles basales son sensiblemente menores que los del molibdeno. Iversen *et al*. encontraron, para una población danesa, una concentración media para el molibdeno de 42.5 μg L^{-1} (rango 3.8 – 182.7 μg L^{-1}) [17], mientras que Heitland y Köster para una población alemana no expuesta encontraron un valor medio de 45 μg L^{-1} (rango 10 – 174 μg L^{-1}) [18]. Sievers *et al*. midieron la concentración urinaria de molibdeno en recién nacidos alemanes con una mediana de 4.0 μg L^{-1} (rango <1.0 – 123 μg L^{-1}) [19].

Zeiner *et al*. han proporcionado datos tanto de molibdeno como de titanio en orina sobre una población de Viena: molibdeno, 57.7 (rango 3.91 – 745); titanio, 9.97 (rango 0.23 – 46.0). Los valores están expresados como μg del elemento/ g creatinina que, con propósitos de comparación, pueden considerarse equivalentes a μg L^{-1} [20].

Varios estudios se han centrado en la determinación de molibdeno y, especialmente, de titanio en pacientes con implantes metálicos [7,12,21], aunque la mayoría han analizado los niveles en suero o en sangre total.

En el trabajo que puede considerarse el germen del interés por la determinación de elementos traza en pacientes implantados, Jabobs *et al*. indicaron que las concentraciones séricas de titanio se elevaban desde <2 μg L^{-1} hasta aproximadamente 4 μg L^{-1} (mediana 3.34 μg L^{-1}, rango <2.11 – 5.28 μg L^{-1}) cuando el tipo de prótesis estudiada (rótula con refuerzo metálico) funcionaba bien. Por el contrario, el grupo de pacientes con implante fallido mostraba una concentración media de titanio en suero de 135.6 μg L^{-1} (rango 24.1 – 716 μg L^{-1}) [6].

Valores parecidos proporcionan Vendittoli *et al*. en su seguimiento de pacientes con prótesis de cadera de dos tipos. Antes de la operación, la concentración de titanio en sangre era de 0.57 μg L^{-1}, que pasaba a valores entre 3.73 μg L^{-1} y 5.25 μg L^{-1} (según el tipo de prótesis) tras tres meses con el implante y descendía hasta 1.30 μg L^{-1} y 1.87 μg L^{-1} dos años después [8].

Dos estudios transversales investigaron el contenido de molibdeno y titanio en orina en un grupo de control (sin implantes metálicos) y otro con diferentes tipos de prótesis de rodilla o de cadera que mostraban buen funcionamiento. La conclusión fue que no existían diferencias (o eran muy pequeñas) entre ambos grupos con valores de entre <0.5 - 1 μg L^{-1} para el titanio, y entre 10 - 60 μg L^{-1} para el molibdeno [5,22]. La diferencia entre estos valores (así como los de Vendittoli *et al*.) con los obtenidos por Jacobs en el caso de implantes con mal funcionamiento son evidentes.

En resumen, existe evidencia de que el funcionamiento de las prótesis metálicas en pacientes implantados puede valorarse mediante la monitorización en sangre y/o orina de los elementos comúnmente utilizados en las aleaciones metálicas, como por ejemplo molibdeno y

titanio. Un aumento significativo de sus niveles reflejará su liberación desde el implante y, por lo tanto, que la prótesis funciona incorrectamente.

En este apartado se pretende desarrollar un método para la determinación de molibdeno y titanio en orina que pueda servir como control de implantes con funcionamiento incorrecto y, de forma más general, para realizar estudios epidemiológicos. Las novedades sobre los métodos existentes consisten en:

1) Recoger la muestra sobre papel de filtro (*DUS: Dried Urine Spot*) con las ventajas ya apuntadas en el caso de la determinación de plomo en sangre: fácil toma de muestra por el propio paciente en su casa y envío cómodo al laboratorio.

2) Realizar la determinación simultánea de ambos analitos aprovechando la capacidad polielemental de la *GF-AAS* de alta resolución comentada en el Apartado III.3.

La única referencia que se ha encontrado sobre determinaciones de titanio o molibdeno mediante *GF-AAS* de alta resolución es la de este último, realizada muy recientemente, en filtros de fibras de vidrio [23]. La determinación simultánea de ambos implica encontrar una región espectral que presente líneas suficientemente sensibles de los dos elementos y diseñar un programa de temperaturas para el horno de grafito que consiga la atomización simultánea de los mismos.

En cuanto a la recogida de la muestra, aunque los *DBS* y los *DUS* parezcan muy semejantes, la problemática para ambos tipos de muestras es distinta. La sangre líquida presenta una elevada viscosidad de forma que su deposición sobre el papel de filtro clínico produce gotas secas de un tamaño relativamente pequeño, mientras que cuando se deposita un pequeño volumen de orina sobre el mismo papel, la reducida viscosidad de la orina hace que difunda mucho más libremente, ocupando una superficie mucho mayor que la sangre. Esto hace que la cantidad de analito por unidad de superficie de papel sea menor y puede propiciar la aparición de efectos cromatográficos. Algunos de estos problemas quedan reflejados en el trabajo de Kumtabtim *et al*. [24] que utilizaron la técnica de *LA-ICP-MS* para intentar la determinación de elementos traza sobre *DUS*.

Además, mientras la metodología para la preparación de los *DBS* está consensuada y descrita en detalle por diferentes entidades bioanalíticas internacionales (*National Committee for Clinical Laboratory Standards*, USA [25], *European Bioanalysis Forum* [26]), no hay un criterio uniforme en cuanto a la recogida de los *DUS* y, prácticamente, cada aplicación descrita utiliza un método distinto de preparación de la muestra.

Esto no debe resultar extraño pues, mientras la utilización de un método mínimamente invasivo para la recogida de sangre capilar justifica claramente el uso de los *DBS* (especialmente cuando se aplica a recién nacidos), este no es el caso de la orina que es probablemente el fluido biológico más fácil de colectar. De hecho, las razones para la preparación de los *DUS* son fundamentalmente de tipo logístico [27]: el papel de filtro tiene un efecto estabilizador [28] que permite la conservación incluso a temperatura ambiente para muchos analitos [29] y el transporte de los *DUS* puede realizarse por correo ordinario.

Al margen del citado trabajo de Kumtabtim *et al*. [24] no hay otros ejemplos de determinaciones elementales sobre *DUS* pues el resto de los existentes están dedicados a la detección de metabolitos y fármacos [30-34].

Representatividad de las muestras de orina.

El control de los diversos analitos contenidos en la orina presenta el problema de la variabilidad de la concentración de los mismos en periodos relativamente cortos de tiempo.

Así, si por cualquier razón se incrementa o disminuye la diuresis (volumen de orina excretado por unidad de tiempo), es previsible que se produzca una disminución o aumento de la concentración en la misma de los distintos analitos.

Una solución a este problema consiste en recoger toda la orina durante un periodo de tiempo suficientemente amplio como para que las variaciones puntuales en la diuresis se vean compensadas. Así, la recolección de orina durante 24 horas sería representativa del ciclo fisiológico más natural [35]. Ahora bien, esta toma de muestra resulta muy engorrosa para el paciente y, en la práctica, a menudo se observan recogidas incompletas.

Como alternativa a la solución anterior, en los laboratorios clínicos es muy habitual expresar la concentración de los distintos analitos en orina normalizada en función de la concentración de la creatinina, lo que permite que los análisis se realicen con una sola muestra tomada a cualquier hora del día. Se supone que cuanto mayor volumen de orina se recoja más diluida estará, pero que este hecho afectará en la misma medida a la concentración del analito que a la de la creatinina.

Pese a su amplia aceptación, el uso de la creatinina para normalizar los contenidos de analitos en la orina no está exenta de problemas. Por supuesto, la excreción de la creatinina depende de la masa muscular del individuo, que varía con la edad, por lo que se requiere estratificar en diferentes tramos etarios para la interpretación de los resultados. Además existen otras muchas causas que modifican el contenido de creatinina en la orina: dieta, hora del día, sexo, nivel de ejercicio físico, embarazo, diversas enfermedades (fallo renal, etapas finales de distrofia muscular, etc.) y un gran número de fármacos [36].

En el contexto de este trabajo un inconveniente más importante es que se ha comprobado que la creatinina resulta inadecuada para normalizar la concentración de algunos elementos traza en orina, como por ejemplo el mercurio o el plomo, debido a que el mecanismo de excreción de los mismos es diferente del que experimenta la creatinina [37]. Además, muchos neonatos suelen tener valores muy bajos de creatinina lo que invalida, en estos casos, la utilidad de los cocientes analito/creatinina.

Con estas limitaciones y teniendo en cuenta que no se ha descrito ninguna forma de determinación directa de la creatinina en los *DUS*, en este trabajo no se ha utilizado este compuesto para normalizar el contenido de los analitos estudiados en la orina. La necesidad de determinar la creatinina en el *DUS*, tras la extracción con un disolvente adecuado [27,30,38] complicaría la aplicabilidad de los métodos desarrollados y los alejaría de los fines perseguidos de ser sencillos y rápidos.

En consecuencia, y aceptando la inviabilidad práctica de la recogida de orina durante 24 horas, se propone aplicar los procedimientos desarrollados a la primera micción de la mañana. Se tiene así, si no una normalización, al menos una reproducibilidad de condiciones que debe ser suficiente en el desarrollo de las posibles aplicaciones clínicas para las que desarrollan dichos procedimientos: cribados poblacionales, seguimiento evolutivo de pacientes, etc.

III.4.1. Elección de la longitud de onda de trabajo.

El primer requisito para poder realizar la determinación simultánea de molibdeno y titanio es encontrar una región espectral que contenga líneas atómicas de ambos elementos lo suficientemente próximas como para que ambas entren en el reducido rango de medida del detector (en la región ultravioleta, sólo 0.2–0.3 nm). En la Tabla III.4.1 se presentan algunas de las posibilidades existentes [39].

Tabla III.4.1. Algunas regiones espectrales que contienen líneas atómicas de molibdeno y de titanio.

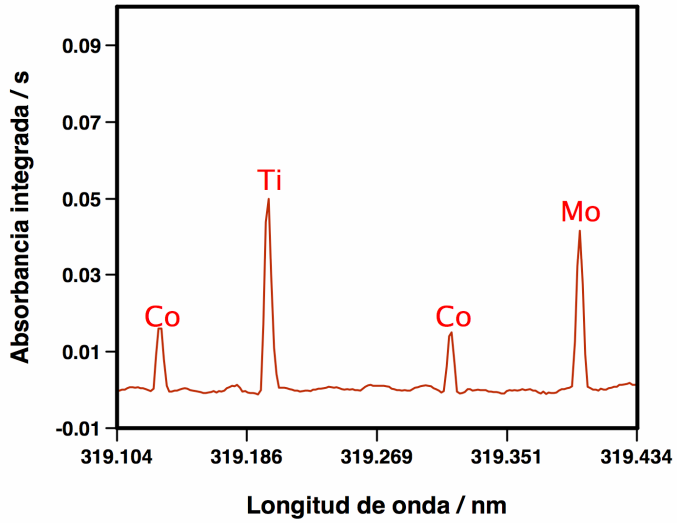
Molibdeno		Titanio	
Longitud de onda	**Sensibilidad**	**Longitud de onda**	**Sensibilidad**
222.025	2.8%	222.145	5.9%
222.392	0.91%	222.319	3.1%
		222.511	5.6%
222.392	0.91%	222.511	5.6%
222.543	1.2%		
222.739	1.3%	222.679	2.9%
264.099	0.12%	264.108	36%
267.985	0.36%	267.992	7.7%
294.421	0.29%	294.199	42%
300.221	0.24%	300.087	8.3%
319.397	56%	319.200	100%
320.883	15%	320.584	0.4%
321.507	0.15%	321.424	6.7%
335.812	0.28%	335.463	77%
335.812	0.28%	336.099	4.3%
		336.126	7.7%
338.462	0.16%	338.594	38%
390.296	32%	390.096	1.7%
390.296	32%	390.478	3.2%

Teniendo en cuenta el bajo contenido de ambos elementos en la orina y el pequeño volumen de la misma retenido por unidad de área en el papel de filtro, en principio, el criterio prioritario será el de la sensibilidad. En consecuencia, el detector del instrumento se centró en 319.270 nm, de forma que cubre un ancho de banda espectral desde 319.104 hasta 319.434 nm (1.95 pm por píxel) y es posible monitorizar simultáneamente líneas resonantes para el titanio (línea localizada a 319.200 nm, que es prácticamente tan sensible como la línea usualmente recomendada para el Ti a 364.267 nm) y el molibdeno (línea localizada a 319.397 nm, que muestra aproximadamente un 60% de la intensidad de señal encontrada para la línea más sensible del Mo a 313.295 nm).

Además, en esta zona espectral se encuentran dos líneas atómicas del cobalto (localizadas a 319.129 nm y a 319.316 nm). Estas líneas exhiben una intensidad muy baja y no son útiles para la determinación de cobalto (su intensidad es aproximadamente un 0.005% de la señal que puede obtenerse para la línea más sensible de este elemento). Sin embargo, ofrecen la posibilidad a usar el cobalto como estándar interno de forma semejante a los estudios realizados en el Apartado III.3.3.

En la Figura III.4.1 se muestra la absorbancia integrada (promediada para 10 s) en función de la longitud de onda para la región espectral seleccionada, obtenida por *GF-AAS* con fuente continua de alta resolución a partir de una muestra de orina fortificada que contiene 200 pg de molibdeno, 1 ng de titanio y 300 ng de cobalto. Las condiciones de medida son las indicadas en la Tabla II.4.

Figura III.4.1. Espectro absorbancia integrada-longitud de onda de una muestra de orina fortificada.



III.4.2. Condiciones de atomización en muestras líquidas.

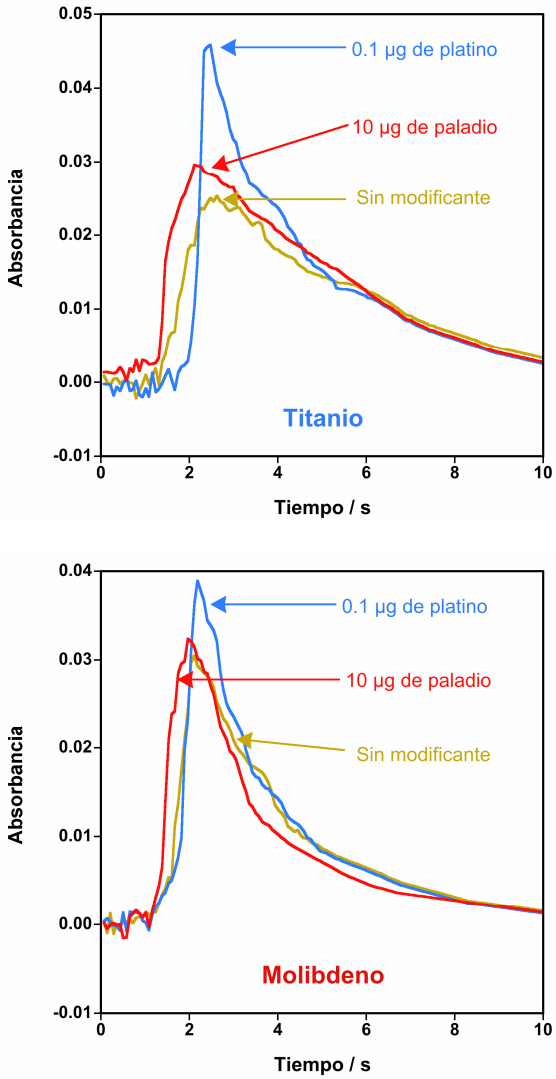
Es bien conocido que tanto el titanio como el molibdeno son elementos muy refractarios, formadores de carburos y que, por lo tanto, requieren el uso de altas temperaturas de atomización. Estas características hacen que las señales típicas que se obtienen para estos elementos presenten una cola apreciable y que sean propensos a provocar *efectos memoria*. Como aspecto positivo, la semejanza de comportamiento de los dos elementos debe facilitar, en principio, la atomización de ambos con el mismo programa de temperaturas.

La dificultad de la atomización del titanio y molibdeno se ha mitigado con el uso de tubos de grafito con calentamiento transversal y, además, algunos autores han propuesto el uso de agentes fluorantes (por ejemplo, freón, NH_4F o HF) como modificantes químicos. Con ellos se obtienen señales con perfiles más cortos y mejor definidos, incrementando además el tiempo de vida de los tubos [40,41]. Desgraciadamente, cuando se usan estos modificantes se pueden producir pérdidas durante la etapa de pirólisis incluso a temperaturas moderadas, especialmente del molibdeno [42].

Dado que en este trabajo se pretende eliminar en dicha etapa la mayor parte de la matriz de las muestras de naturaleza clínica, así como el papel de filtro, se decidió prescindir de estos modificantes. En consecuencia, se prefirió evaluar las prestaciones de los metales del grupo del platino que, normalmente, permiten incrementar la temperatura de pirolisis sin pérdidas de analito. En este sentido, tanto el paladio [43] como el platino [44] se han descrito como modificantes químicos eficaces en la determinación del molibdeno ya que permiten elevar algo la temperatura de pirolisis y producen señales más altas y cortas. Sin embargo, estos trabajos indican que no se mejora de forma significativa la masa característica cuando se utiliza la absorbancia integrada para la cuantificación de la señal.

El estudio de estos modificantes químicos con disoluciones acuosas de molibdeno y de titanio ratificó esencialmente las conclusiones anteriores, como puede verse en la Figura III.4.2. La incidencia del paladio en la atomización de ambos elementos es muy escasa, mientras que el platino parece tener una influencia un poco mayor, especialmente para el titanio.

Figura III.4.2. Señales obtenidas en la atomización de 200 pg de molibdeno y 1 ng de titanio en disolución acuosa sin modificantes químicos y en presencia de platino (0.1 µg) o paladio (10 µg).



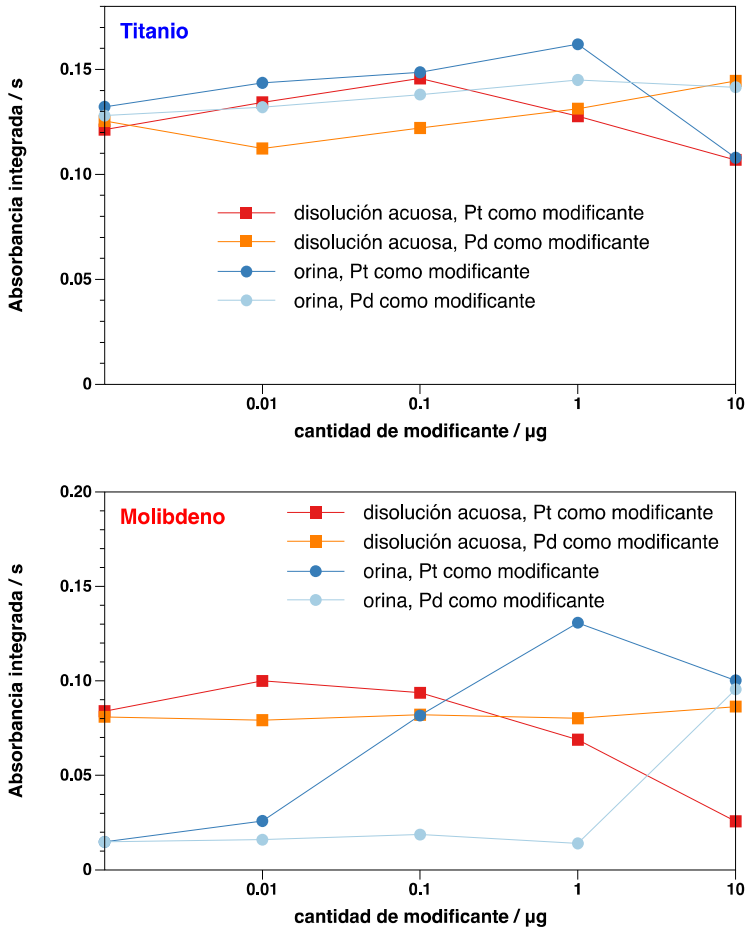
Sin embargo, mientras las ventajas del uso de modificantes químicos en la medida mediante *GF-AAS* de disoluciones acuosas de molibdeno y de titanio pueden considerarse moderadas, resultaron determinantes cuando se trabajó con muestras reales de orina, especialmente en el caso del molibdeno. En efecto, en ausencia de modificantes químicos, cuando se atomizan muestras de orina fortificadas, no se detecta absolutamente ninguna señal para este elemento, lo que puede explicarse por el alto contenido de cloruro presente en la orina (aproximadamente, 1000 mg L^{-1}) [45] pues ya se ha documentado que este anión puede provocar pérdidas de molibdeno por formación de complejos volátiles [44,45]. Por el contrario, por adición de platino o de paladio a la orina fortificada, se obtuvieron señales bien definidas y semejantes a las generadas a partir de disoluciones acuosas de los elementos.

Se estudiaron las cantidades de modificante químico óptimas para la medida de molibdeno (200 pg) y de titanio (1 ng) en disolución acuosa y en orina dopada, con los resultados que se representan en la Figura III.4.3. En el caso del molibdeno en la orina se observa que si se utiliza paladio, la cantidad óptima requerida (10 µg) es sensiblemente mayor que si se usa platino (1 µg); además, en este caso, la cantidad de modificante debe regularse con más cuidado, pues el

uso de cantidades superiores a 1 µg de platino produce una importante reducción de la señal obtenida. La influencia de los modificantes en la medida del titanio es escasa, aunque también se observa una pérdida de señal al aumentar la cantidad de platino.

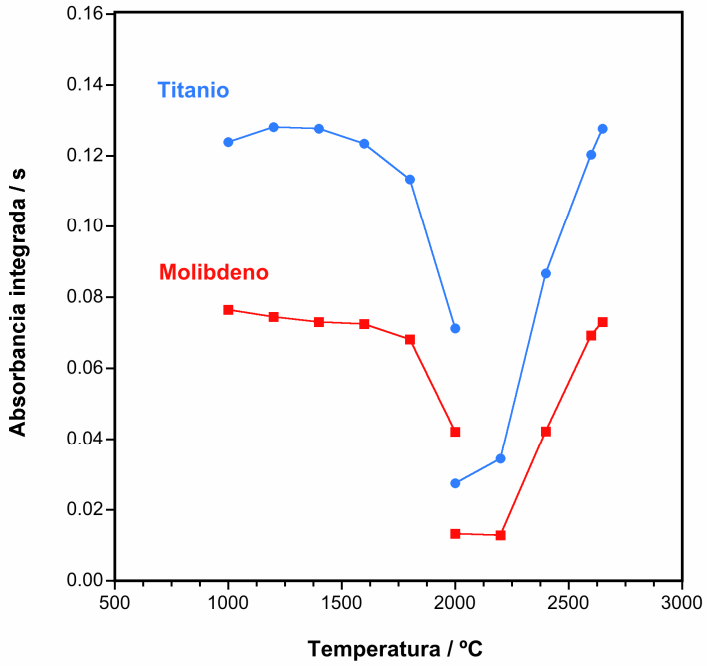
En principio este comportamiento no debe atribuirse a fenómenos de sobreestabilización, ya que la señal no presenta más cola, sino a pérdidas de analito. En efecto, el incremento de la cantidad de platino implica también la introducción de una cantidad mayor de cloruro, ya que el metal se encuentra disuelto como $PtCl_6^{2-}$ en medio clorhídrico, lo que puede propiciar pérdidas por formación de complejos volátiles como se ha comentado anteriormente.

Figura III.4.3. Absorbancia integrada obtenida en la atomización de 1 ng de titanio y 200 pg de molibdeno, en disolución acuosa y orina fortificada, en función de la cantidad de platino o paladio.



Dado que tanto el paladio como el platino permiten elevadas temperaturas de pirolisis y parecen capaces de solventar el problema que plantea la presencia de cloruro en las medidas del molibdeno, se eligió finalmente el platino por requerirse menos cantidad del mismo. Finalmente, en la Figura III.4.4 se presentan las curvas de pirolisis y atomización para una orina fortificada con 200 pg de molibdeno y 1 ng de titanio y a la que se ha añadido 1 µg de platino.

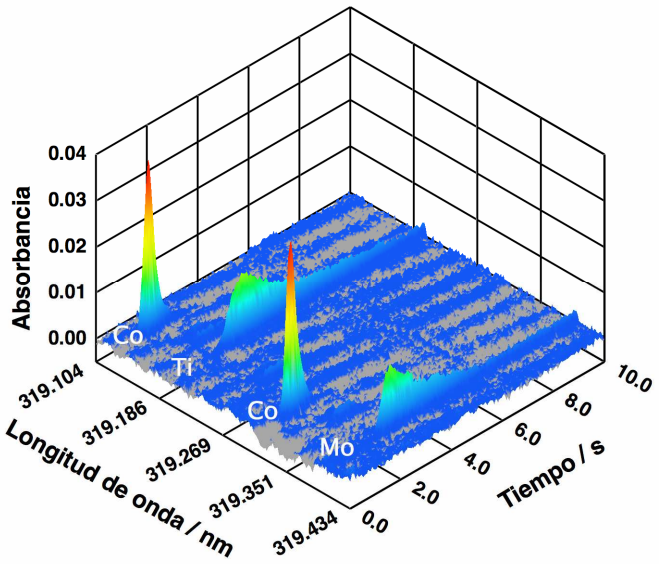
Figura III.4.4. Curvas de pirolisis y atomización del molibdeno y del titanio, con 1 µg de platino, en orina fortificada.



Puede observarse que con uso del platino se puede aumentar la temperatura de pirólisis hasta 1600 ºC pero, como era previsible, hay que seguir manteniendo una temperatura de atomización muy elevada (2650 ºC) para lograr la máxima sensibilidad. Dado que en estas condiciones de trabajo (elevada temperatura de atomización durante un tiempo relativamente largo) el deterioro de tubos y plataformas es importante, se estudió el uso de modificantes químicos permanentes (wolframio y circonio) para una mejor protección de aquéllos. Los resultados no fueron satisfactorios pues la presencia de dichos modificantes provocaba una pérdida muy significativa en la intensidad de la señal del molibdeno, que quedaba reducida a aproximadamente una décima parte de la que se obtiene en ausencia de los mismos.

La Figura III.4.5 muestra los perfiles de señal típicos que pueden obtenerse para una muestra de orina bajo las condiciones de trabajo finalmente adoptadas y que se presentan en la Tabla II.4.

Figura III.4.5. Espectro absorbancia integrada-longitud de onda-tiempo de una muestra de orina fortificada.



Los valores de masa característica obtenidos muestran un acuerdo excelente con los que pueden esperarse para estos elementos [46]: 14 pg para el molibdeno y 44 pg para el titanio.

Por otra parte, como se comentó anteriormente y se puede observar en las Figuras III.4.1 y III.4.5, junto a las señales de molibdeno y de titanio es posible monitorizar simultáneamente el cobalto, elemento que podría actuar como estándar interno, ayudando a corregir efectos de matriz y/o mejorar la precisión, como se ha explicado en el Apartado III.3 y se ha demostrado en otras situaciones [47].

Sin embargo, para conseguir estos efectos positivos en *GF-AAS* es importante que el patrón interno y el/los analito/s se vaporicen y atomicen simultáneamente, y así estén sometidos exactamente a las mismas condiciones en todo el proceso de medida. Como puede verse en la Figura III.4.5, este no es el caso, ya que el cobalto es más volátil que los dos analitos. De hecho, el uso del cobalto como estándar interno resulta incluso ligeramente perjudicial para la precisión, ya que se obtienen unos valores de DSR entre el 7-8% para las señales de molibdeno y titanio en orina, mientras que estos valores se deterioran hasta el 10-12% cuando se consideran las señales Ti/Co y Mo/Co. Este hecho prueba que, cuando no hay una buena correlación entre las causas de imprecisión del analito y del elemento utilizado como patrón interno, el uso de éste sólo incrementa la incertidumbre global de la medida, como se demuestra en el Apartado III.3.3.

Pese a que se desestimó el uso de cobalto como patrón interno, este elemento se añadió a algunas muestras para utilizarlo como indicador visual de la deposición de orina en el papel de filtro. Las muestras reforzadas con una cantidad relativamente elevada de cobalto presentan una tonalidad rosácea y en estas condiciones es muy sencillo visualizar el área sobre la que se extiende la deposición de orina una vez seca, lo que no resultaba sencillo con muestras puras de orina, sobre todo en las menos coloreadas.

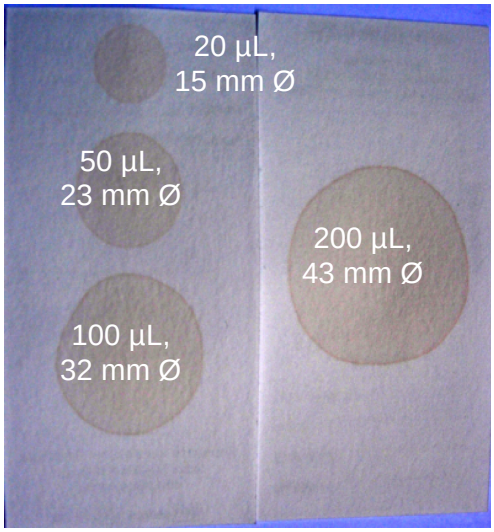
III.4.3. Estudio de la deposición de orina sobre papel de filtro en condiciones de difusión libre.

Tras la optimización de las condiciones para la medida del molibdeno y del titanio en muestras líquidas de orina se pasó a investigar el comportamiento de estos elementos tras la deposición de la orina en un papel de filtro. Para ello se depositaron con una micropipeta distintos volúmenes de orina reforzada con los analitos sobre tarjetas Whatman 903, papel de filtro de un tamaño relativamente grande (115 x 55 mm), sobre el que la orina podía difundir libremente.

Tras su secado, se troquelaron discos de 3.2 mm de diámetro y éstos se analizaron directamente por medio de *GF-AAS*. Las señales obtenidas presentaban una forma similar a las de la orina líquida aunque aparecían un poco retrasadas (1.0-1.5 s) y con más cola, por lo que para tratar de minimizar este aspecto se incrementó el tiempo de atomización hasta 15 s. Sin embargo, la sensibilidad resultó completamente insatisfactoria ya que sólo se observaban señales de absorción atómica cuando la concentración de los analitos en la orina alcanzaba cientos de µg L^{-1}.

Este problema puede atribuirse al procedimiento de deposición y a las características físicas de la orina que tiene una viscosidad mucho menor que la de la sangre estudiada en apartados anteriores y, por tanto, su difusión libre sobre el papel de filtro es mucho mayor. En la Figura III.4.6 se puede apreciar la superficie sobre la que se extienden distintos volúmenes de orina depositados sobre el papel Whatman 903. Mientras la deposición de 50 µL de sangre ocupaba un círculo de aproximadamente 11.5 mm (ver la figura III.1.8), en el caso de la orina esta superficie se extiende hasta aproximadamente 23 mm.

Figura III.4.6. Superficie de papel de filtro Whatman 903 ocupado por distintos volúmenes de orina.



En consecuencia, la cantidad de orina retenida por unidad de superficie será mucho menor que en el caso de la sangre y por lo tanto también lo será la cantidad de analito introducida en el horno de grafito en cada disco troquelado de 3.2 mm. La Figura III.4.6 ilustra que depositar una cantidad de muestra mayor no resuelve este problema pues la orina simplemente se extiende en una superficie mayor y de forma prácticamente proporcional, pues se comprobó que el área ocupada por cada µL de orina depositado era bastante constante, con un valor aproximado de 0.08 cm^2.

Existen varias opciones obvias para aumentar la cantidad de analito introducida en el horno de grafito, aunque en principio ninguna de ellas parece demasiado prometedora:

1) Introducir en la plataforma más de un disco troquelado para realizar cada una de las medidas. Aunque es posible, en principio, apilar hasta tres discos en la plataforma, esta solución parece un poco engorrosa y, sobre todo, no proporcionará la mejora de sensibilidad que se necesita.

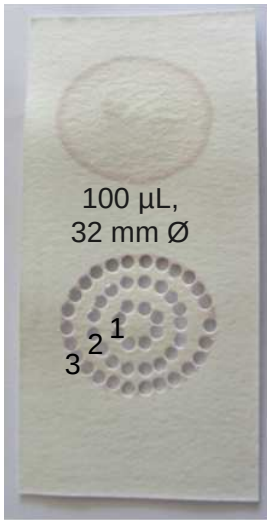
2) Usar otro tipo de papel con mayor capacidad de absorción, como se ha propuesto en algunas ocasiones para el análisis de algunos *DMS* [27,48]. Obviamente hay muchas marcas y tipos de papel de filtro disponibles en el mercado con un grosor y capacidad de absorción variables que pueden ser alternativas válidas al Whatman 903 o Perkin Elmer 226, que son los únicos aprobados por la *Food and Drug Administration* como "dispositivos médicos de clase II". En consecuencia, no se consideró que esta solución fuese satisfactoria, ya que representaría una dificultad para el uso del método en el ámbito clínico, donde se propugna el uso de materiales de características fuertemente reguladas.

3) Realizar varias deposiciones de orina sobre el mismo papel con secado del mismo entre ellas (método *multi-spot*). Habida cuenta que el tiempo de secado típico es de al menos una hora, esta alternativa no parece muy atractiva, especialmente si se pretende desarrollar un método que permita la recogida no supervisada de la muestra en el hogar.

Por otra parte, la deposición de la orina en el papel de filtro permitiendo la libre difusión de la misma, además de ocupar una superficie de papel excesiva, lo que disminuye la concentración de los analitos por unidad de superficie, presenta problemas de homogeneidad en la distribución de los mismos.

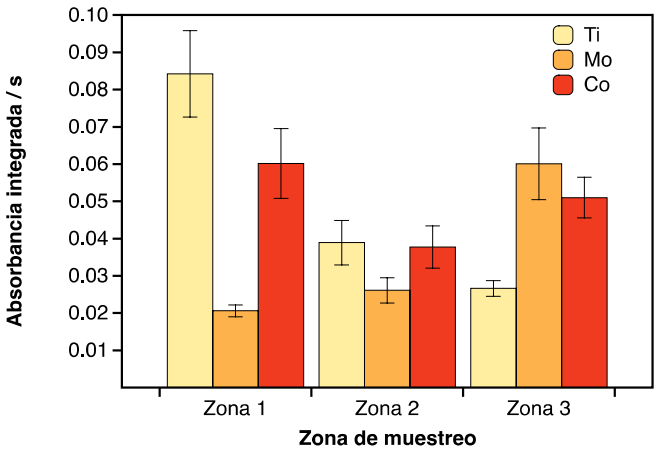
Para comprobar dicha distribución se diseñó una experiencia semejante a la realizada para estudiar la homogeneidad del plomo en los *DBS* que se comentó en el Apartado III.1.3. Se prepararon *DUS* de orina fortificada con concentraciones suficientemente elevadas de los analitos (500 µg de Mo L^{-1}, 2000 µg de Ti L^{-1}) como para ser medidos con facilidad en los pequeños círculos troquelados y se realizó la deposición de 100 µL de la misma en el papel de filtro. Tras el secado del papel se tomaron discos de diferentes zonas dentro del área del *DUS*, tal como se muestra en la Figura III.4.7. La zona 1 corresponde a una distancia de 3 mm desde el centro de la deposición, la zona 2 a una distancia de 9 mm y la zona 3 a una distancia de 15 mm. Esta última zona delimita con el final del área de deposición que se aprecia claramente debido a la adición a la orina de una elevada cantidad de cobalto (500 mg L^{-1}).

Figura III.4.7. Zonas troqueladas para el estudio de la homogeneidad.



Los resultados obtenidos por *GF-AAS* para cada uno los elementos a partir de los discos troquelados en las tres zonas descritas anteriormente (3 medidas por zona) se presentan en la Figura III.4.8.

Figura III.4.8. Señales de titanio, molibdeno y cobalto en las distintas zonas del *DUS* tras deposición de 100 µL de orina fortificada.



Las barras de incertidumbre corresponden a la desviación estándar de las medidas.

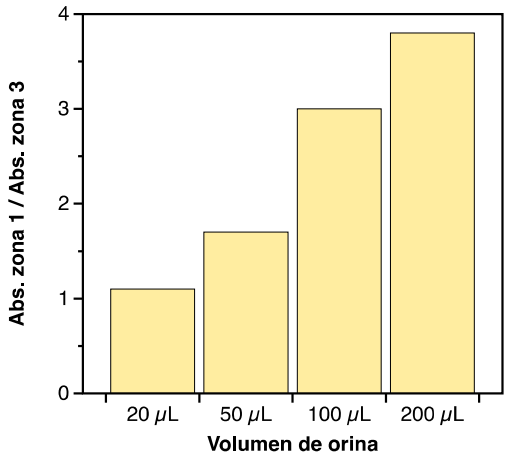
Puede observarse que para los tres elementos estudiados se producen efectos cromatográficos, que además son diferentes entre ellos. El titanio tiende a acumularse en el centro del *DUS*, mientras que el molibdeno tiende a migrar hacia el borde. El cobalto muestra un comportamiento menos definido aunque su acumulación en el mismo borde puede observarse a simple vista y, en realidad, ayuda a definir el límite de la superficie en la que se ha depositado la orina, como se aprecia con claridad en la Figura III.4.7.

Se probó a realizar varias deposiciones de orina sobre el mismo papel de filtro (tres, cinco e incluso diez veces) para ver si se podía lograr una distribución más homogénea, pero los resultados mostraron la misma tendencia que la reflejada en la Figura III.4.8.

Finalmente se puede mencionar que la migración de los distintos analitos en el *DUS* depende de la cantidad de orina depositada en el mismo, de forma que cuanto mayor es ésta, mayor es la proporción del elemento que queda retenido en las zonas centrales del *DUS* con

respecto a la periferia del mismo, como puede observarse en la Figura III.4.9 referida al titanio (el molibdeno y el cobalto presentaron una tendencia semejante).

Figura III.4.9. Relación entre las señales de titanio obtenidas en las zonas extremas del *DUS* al adicionar diferentes volúmenes de orina fortificada.



Este comportamiento parece lógico ya que los analitos sufrirán una retención, mayor o menor, por interacción con la celulosa y por lo tanto, cuanto mayor sea la distancia entre el punto de deposición y el límite del *DUS* (aproximadamente 8 mm cuando se depositan 20 µL y 22 mm si se depositan 200 µL: ver la Figura III.4.6) más difícil les será aproximarse a dicho límite.

A la vista de estas experiencias parece muy difícil desarrollar una estrategia de cuantificación adecuada. Por una parte, la sensibilidad resulta inadecuada por la excesiva extensión del *DUS* generado y por otra, aunque se añada una cantidad constante de orina, la posición exacta en la que se troquelen los discos que serán introducidos en el horno de grafito influirá de forma apreciable en los resultados. Además se comprobó que la composición concreta de cada orina introducía una variable adicional en los resultados pues, aunque el comportamiento *general* del molibdeno y titanio en todas las muestras estudiadas se ajustaba a la tendencia descrita anteriormente, la extensión con la que los elementos se concentraban en el centro o en la periferia presentaba ciertas variaciones que llegaron a ser del 20-30% entre diferentes muestras, indicando claramente una influencia de la matriz en este proceso de distribución.

La posibilidad de utilizar un estándar interno para corregir este efecto cromatográfico (que era uno de los propósitos iniciales de la adición de cobalto, aunque ya quedó invalidado por sus diferentes condiciones de atomización) resulta inviable dado que los distintos elementos presentan un comportamiento diferente en su migración a lo largo del papel de filtro. En conclusión, se necesita un procedimiento diferente de deposición de la muestra en el soporte sólido para desarrollar un método que sea, por un lado, mucho más sensible y, por otro, que asegure una distribución suficientemente homogénea del analito sobre aquél.

Finalmente y como un aspecto tangencial de los estudios realizados, se puede señalar que conforme la tecnología de los *DMS* se ha ido extendiendo a muestras biológicas de naturaleza distinta a la sangre, resulta más importante ver el área de la gota seca en el papel de filtro, pues se recomienda troquelar los discos de la misma zona del *DMS* [26]. Ahora bien, muestras como el suero, la orina o, incluso, el líquido cefalorraquídeo son muy difíciles, o imposibles, de visualizar una vez secas en un papel de filtro, hasta el punto de que Whatman ha lanzado recientemente al mercado la tarjeta 903 de color azul para solventar este inconveniente cuando se trabaja con muestras como las citadas.

Aunque no se ha realizado estudio específico del tema, de los ensayos realizados en este trabajo se deduce que la adición de cobalto podría ser una solución sencilla a este problema y en todo caso resulta ventajosa sobre la utilización de colorantes orgánicos (se probaron naranja de metilo y negro de ericromo T) ya que éstos tienen mayor tendencia a permanecer en el centro del *DUS* y por lo tanto no sirven para visualizar toda la superficie del mismo.

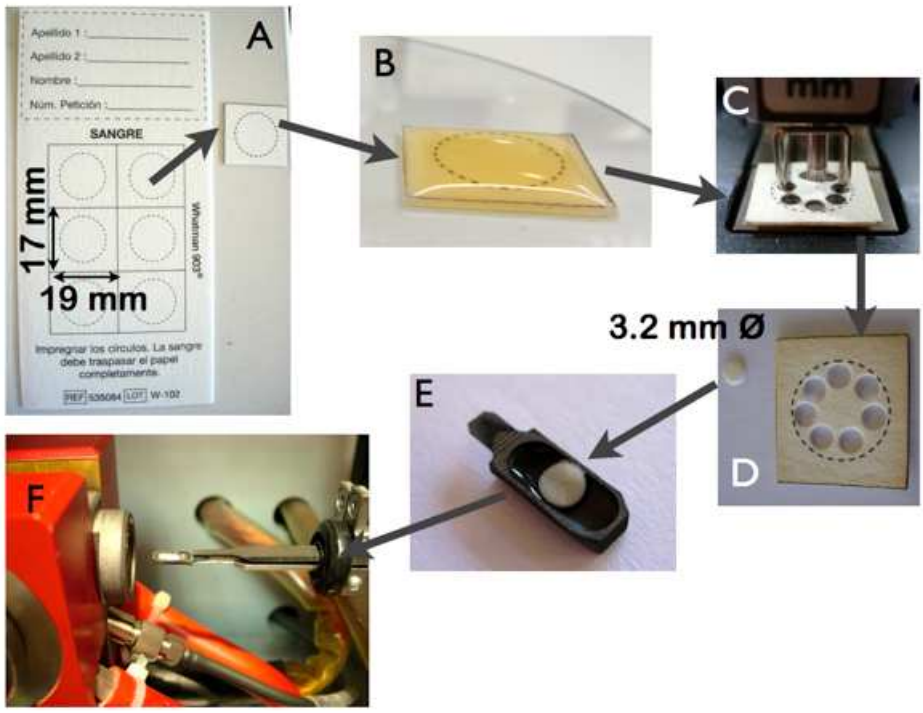
III.4.4. Estudio de la deposición de orina sobre papel de filtro en condiciones de difusión limitada.

Para solucionar el problema de la excesiva difusión de la orina en el papel de filtro, que conduce a una baja sensibilidad y a la aparición de efectos cromatográficos, algunos autores han propuesto el uso de membranas de teflón como sustitutos de los papeles de filtro clínicos. Evidentemente, debido a sus propiedades hidrófobas, la orina depositada encima de una membrana de teflón ocupará una superficie mucho menor [24]. Sin embargo, aunque esta situación puede ser ventajosa desde un punto de vista meramente analítico, el uso del teflón resulta muy poco práctico con propósitos clínicos, ya que la muestra sólo se adhiere a la superficie de la membrana, dando lugar a un espécimen mucho menos estable, inadecuado para su envío por correo.

En este trabajo se ha investigado una alternativa potencialmente más atractiva pues combina la utilización de cualquiera de los dos tipos de papel de filtro registrados por la *Food and Drug Administration* como “dispositivos médicos de clase II” con el uso de superficies hidrófobas. El procedimiento, que a partir de aquí denominaremos *PS-DUS* (*precut-saturated DUS*), consiste en cortar una porción del papel de filtro clínico de 17x19 mm, depositarlo encima de una superficie hidrófoba como policarbonato y dispensar un volumen adecuado de orina sobre dicho trozo de papel de filtro. Evidentemente, en estas condiciones la difusión de la orina depositada está limitada por la superficie del fragmento de papel de filtro clínico cortado.

Se pueden observar estas operaciones en la Figura III.4.10 (A y B) que muestra las etapas para realizar las determinaciones mediante *GF-AAS* de molibdeno y titanio en orina depositada en un *PS-DUS* y que, salvo la deposición de la muestra, es semejante a la utilizada para la determinación de plomo en sangre (Figura III.1.2) por lo que no se reitera su explicación.

Figura III.4.10. Etapas para la determinación de molibdeno y titanio en orina depositada en *PS-DUS* mediante *GF-AAS* con fuente continua.



A) Parte del papel de filtro Whatman 903 utilizado para la deposición de la orina. B) Trozo de papel de filtro colocado encima de una superficie de policarbonato y sobre el que se han depositado 500 µL de orina. C y D) Troquelado de discos de 3.2 mm tras secado del *PS-DUS*. E y F) Colocación de un disco troquelado en la plataforma tras adición del modificante químico e introducción del mismo en el horno de grafito.

El papel de filtro utilizado procedía de tarjetas del programa autonómico de cribado neonatal de enfermedades metabólico-endocrinas. Los trozos obtenidos, cortados con geometría prácticamente cuadrada siguiendo las marcas de tinta impresa, eran de suficiente tamaño como para poder dividir su superficie en diferentes zonas de las que poder troquelar varios discos de 3.2 mm de diámetro. Como se verá en el Apartado III.5 de esta Memoria, se pueden preparar fragmentos de papel de forma circular en lugar de cuadrada lo que permite estudiar de una forma más clara la distribución espacial de los distintos analitos (toda la periferia del papel estará a la misma distancia del centro donde se depositará la muestra) y utilizar un troquelador para obtener estos trozos de papel de filtro de forma más reproducible, ya que, en general, todos los troqueladores comerciales están diseñados para la realización de agujeros con geometría circular.

Lógicamente, aunque la capacidad de difusión de la orina esté disminuida por la presencia del policarbonato, la cantidad de muestra que puede añadirse sin superar la capacidad de retención del papel es limitada. Se comprobó que, para los trozos de papel de filtro del tamaño utilizado, el máximo volumen de orina completamente retenido por la tensión superficial es de unos 500 µL. Esto supone que el contenido en orina en el papel de filtro es de aproximadamente 150 µL orina cm^{-2}.

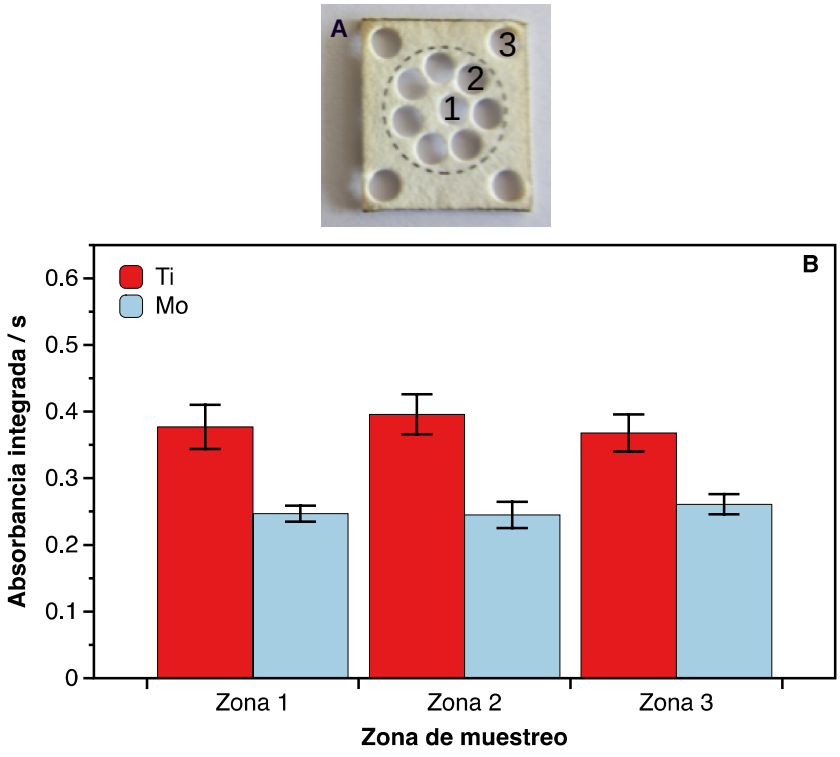
Si se comparan las superficies ocupadas por 500 µL de orina depositados sobre un papel de filtro convencional y sobre el *PS-DUS*, aquéllas resultan unas doce veces mayores lo que quiere decir que la cantidad de muestra retenida en el *PS-DUS* por unidad de superficie, y consecuentemente las concentraciones de molibdeno y titanio, es unas doce veces mayor que en caso de difusión libre de la orina.

Este factor de enriquecimiento estimado se confirmó experimentalmente midiendo mediante *GF-AAS* la absorción atómica del molibdeno y del titanio a partir de círculos troquelados de *PS-DUS* y de *DUS* de libre difusión (en este caso se tomaron círculos de la zona 2 de la Figura III.4.7 que puede considerarse que proporcionan un valor medio) sobre los que se había depositado orina reforzada. Los factores de enriquecimiento obtenidos, razonablemente parecidos a los previstos, fueron de 12.1 ± 1.5 para el titanio y de 10.5 ± 1.0 para el molibdeno. Con estos resultados parece resolverse uno de los dos problemas que planteaba el uso de *DUS* de libre difusión, el de la baja sensibilidad.

El otro problema era el de la desigual distribución de los analitos dentro de la superficie ocupada por la orina depositada. En principio, utilizando los *PS-DUS* la orina no puede difundir libremente y satura por completo el trozo de papel de filtro utilizado, por lo que no deberían presentarse efectos cromatográficos, pero esto es algo que debe comprobarse.

Para ello se diseñó una experiencia semejante a la realizada cuando se utilizaron los *DUS* de libre difusión. Se prepararon diez muestras de orina fortificadas hasta una misma concentración de los analitos de interés (100 µg de Mo L^{-1} y 500 µg de Ti L^{-1}) y se depositaron 500 µL de cada una de ellas en los correspondientes *PS-DUS* que, una vez secos, se troquelaron definiendo tres zonas tal como se indica en la Figura III.4.11.A. Las medidas de la absorbancia integrada del molibdeno y del titanio realizadas en cada una de estas zonas demostraron que se logra un grado de homogeneidad satisfactorio en la distribución de ambos elementos, tal como se refleja en la Figura III.4.11.B.

Figura III.4.11. Señales de titanio y molibdeno en las distintas zonas del *PS-DUS* tras deposición de 500 µL de orina fortificada.



A) Situación en el *PS-DUS* de las zonas estudiadas. B) Absorbancia integrada del molibdeno y titanio en las tres zonas. Las barras de incertidumbre corresponden a la desviación estándar de las medidas.

No se realizó ningún estudio sobre la posible distribución del cobalto ya que la adición del mismo para definir los límites de la orina depositada resulta innecesaria si se trabaja con *PS-DUS* y su utilidad como patrón interno ya se había descartado al estudiar las condiciones de atomización.

Pese a que estos resultados indican que las tres zonas en las que se ha dividido el *PS-DUS* son suficientemente homogéneas, en el borde de los mismos se puede apreciar una ligera intensificación del color, lo que indicaría una mayor cantidad de orina en los mismos. Experiencias posteriores mediante una técnica con un poder de resolución espacial mucho mayor (*LA-ICP-MS*), que se comentarán en el Apartado III.5, demostraron la veracidad de esta presunción.

En este trabajo con *GF-AAS*, como una precaución elemental, se evitó alcanzar dichos bordes cuando se troquelaron los discos de 3.2 mm, lo que no supone ninguna limitación en la práctica ya que el área de los *PS-DUS* permite tomar por lo menos once discos, lo que es más que suficiente para realizar las determinaciones (de acuerdo con los resultados obtenidos para la determinación de plomo en sangre, entre tres y cinco réplicas deberían ser suficientes). El circulo interno de tinta del papel de filtro sirvió de referencia para el troquelado de los discos en zonas equivalentes de diferentes *PS-DUS* (ver la Figura III.4.10.D).

Por otra parte, si se quiere obtener papel de filtro saturado en orina, la metodología *PS-DUS* parece ventajosa en comparación a la técnica de inmersión en la cual, trozos de papel de filtro de mayor tamaño que el utilizado en este trabajo, se sumergen en un recipiente apropiado lleno de la muestra líquida. Con esta forma de trabajo para poder expresar los resultados analíticos como cantidad de analito por volumen de la orina líquida original, se recurre a la capacidad de absorción media del papel de filtro y al área del papel usada para el análisis [27,34,49]. Según las experiencias que realizamos, las señales obtenidas tras usar la técnica de inmersión eran aproximadamente la mitad que si se utiliza un *PS-DUS* y, además, el volumen de orina realmente retenido por el papel de filtro presentaba mayores variaciones.

En conclusión, la deposición de la orina en un *PS-DUS* parece un procedimiento adecuado para la posterior determinación de molibdeno y titanio en aquélla mediante *GF-AAS*. Como inconveniente se puede apuntar que, a diferencia de la sangre, en el caso de la orina es necesario dispensar un volumen definido de la misma en el papel de filtro pero esto no plantea excesivos problemas, incluso si se realiza fuera del laboratorio, por ejemplo por el propio paciente en su hogar. Basta con que disponga de pipetas Pasteur desechables para que pueda dispensar el volumen requerido con suficiente exactitud.

III.4.5. Calibrado.

Como ha sido discutido extensamente en la literatura y se demostró en el Apartado III.1, el método de calibración más fiable cuando se analizan los *DMS* es mediante el uso de patrones emparejados [26,50]. Sin embargo, en este caso, puesto que se conoce el volumen de orina retenido en el *PS-DUS*, en principio, podrían utilizarse patrones acuosos para calibrar, depositándolos en el mismo tipo de papel de filtro precortado.

Trabajando en condiciones de difusión libre se observó que las gotas secas resultantes de la deposición de muestras de orina eran de un tamaño entre el 5-10% más pequeño que los resultantes de un volumen idéntico de estándar acuoso y, además, los elementos estudiados no mostraban exactamente el mismo comportamiento de distribución que en los *DUS*. No se profundizó en este estudio pues la opción de trabajar en condiciones de libre difusión ya se había descartado.

La situación mejoró al trabajar en condiciones de difusión controlada. En efecto, siguiendo el mismo procedimiento que con la orina, pero depositando en el trozo cortado de papel de filtro 500 µL de los correspondientes patrones acuosos, las medidas mediante *GF-AAS* de discos de 3.2 mm tomados de distintas zonas del papel mostraban una buena homogeneidad, semejante a la obtenida con los *PS-DUS*. Sin embargo, las pendientes de las curvas de calibrado resultantes eran entre un 20-30% diferentes (menores para el titanio y mayores para el molibdeno) de las obtenidas con patrones de orina, indicando que se producen algunos efectos de matriz.

Este tipo de sesgo puede ser aceptable para algunas aplicaciones con muestras sólidas cuando sea difícil encontrar patrones adecuados de similar composición a las muestras de interés. Sin embargo, este no es el caso, ya que es relativamente sencillo para un laboratorio clínico fortificar orinas de contenido conocido de molibdeno y titanio o, alternativamente, usar para la calibración materiales de referencia disponibles comercialmente.

En consecuencia, el calibrado se realizó utilizando un conjunto de alícuotas de una orina libre de los analitos de interés y fortificándola con cantidades variables de molibdeno y titanio, desde 20 µg L^{-1} hasta 500 µg L^{-1}. Tras preparar los correspondientes *PS-DUS* como se indica en el Apartado II.4.2, se realizaron las medidas mediante *GF-AAS* en las condiciones indicadas en la Tabla II.4. En la Figura III.4.12 se presentan dos curvas de calibrado típicas para los elementos estudiados y en la Tabla III.4.2 se indican sus principales prestaciones analíticas.

Figura III.4.12. Curvas de calibrado para el molibdeno y el titanio en orina retenida en los *PS-DUS*.

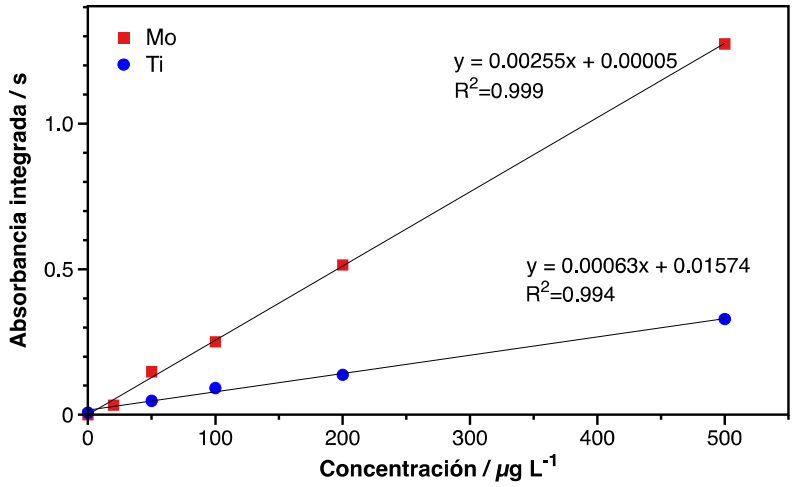


Tabla III.4.2. Características analíticas de la determinación de molibdeno y titanio en orina retenida en los *PS-DUS* mediante *GF-AAS*.

Elemento	Longitud de onda/ nm	Masa Característica/ µg L^{-1}	*LOD*/ µg L^{-1}	Rango de Trabajo/ µg L^{-1}
Mo	319.397	1.6	1.5	al menos, hasta 500
Ti	319.200	6.6	6.5	al menos, hasta 500

Las curvas de calibrado presentan buena relación lineal entre la absorbancia integrada y las concentraciones de molibdeno y titanio en la orina hasta, al menos 500 µg L^{-1}, con coeficientes de correlación semejantes a los obtenidos para el plomo en sangre, ligeramente mejor en el caso del molibdeno y un poco peor en el del titanio.

Los límites de detección resultantes son relativamente altos, de forma que en el caso del titanio no resultan adecuados para el análisis en pacientes con prótesis que funcionan bien, ya que se esperan valores para el titanio de muy pocos µg L^{-1} e incluso inferiores a 1 µg L^{-1} que se pueden obtener mediante el uso de la técnica de *ICP-MS* [1,5,22]. Sin embargo, el procedimiento propuesto en este trabajo parece apropiado para implantar protocolos de recogida de muestras en el hogar, ya que permitirán determinar las altas concentraciones de estos elementos que son de esperar en el caso de implantes con mal funcionamiento.

III.4.6. Validación de la determinación directa y simultánea de molibdeno y titanio en orina.

El procedimiento propuesto de deposición de la muestra de orina (*PS-DUS*) descrito en el Apartado II.3.6 y posterior determinación simultánea de molibdeno y titanio mediante *GF-AAS* según las condiciones que se detallan en el Apartado II.5.4, se validó mediante el análisis de dos materiales de referencia comúnmente empleados en los laboratorios clínicos: *Clincheck Urine Control Level II* y *Seronorm Trace Element Urine Control*. Dado que el titanio está ausente en el producto de *Clincheck* y su concentración está cerca del límite de cuantificación en el de *Seronorm*, ambos materiales de referencia se fortificaron con una disolución de titanio de forma que se alcanzó una concentración final de 100 y 121 µg de Ti L^{-1}, respectivamente.

Los resultados obtenidos en cinco determinaciones independientes (el resultado de cada una de las cuales es la mediana de la medida de tres círculos de 3.2 mm de diámetro tomados del *PS-DUS* correspondiente) de molibdeno y titanio mediante *GF-AAS* según el método propuesto se presentan en la Tabla III.4.3.

Tabla III.4.3. Resultados obtenidos para la determinación simultánea de molibdeno y titanio en dos materiales de referencia preparados como *PS-DUS*.

		Clincheck II		***Seronorm***	
Elemento	**Longitud de onda / nm**	**Resultado / µg L^{-1}**	**Valor de Referencia / µg L^{-1}**	**Resultado / µg L^{-1}**	**Valor de Referencia / µg L^{-1}**
Mo	319.397	103.5 ± 8.1	109 ± 22	50.4 ± 2.5	49.3 ± 1.3
Ti	319.200	98.9 ± 9.8	100*	123 ± 12	121**

La incertidumbre está expresada como desviación estándar, excepto para el valor de referencia del molibdeno en *Clincheck II* (intervalo de confianza al 95%).
* La muestra no contenía titanio y fue dopada con 100 µg Ti L^{-1}.
** La muestra contenía 21.0 ± 3.1 µg Ti L^{-1} y fue dopada con 100 µg Ti L^{-1}.

La concordancia de los valores obtenidos con los certificados es plenamente satisfactoria y los valores de DSR se mantienen en todos los casos por debajo del 10%, lo que se considera normal en las determinaciones directas sobre muestras sólidas mediante *GF-AAS*. De esta forma se demuestra la validez del método desarrollado con la única limitación de la insuficiente sensibilidad del titanio comentada anteriormente.

Pese al carácter refractario del molibdeno y del titanio sólo se presentaron efectos de memoria significativos cuando se atomizaron muestras con concentraciones muy elevadas de estos elementos (a partir de 1000 µg L^{-1}), valores que no deben aparecer en orina humana. En cuanto al tiempo de vida útil de los tubos de grafito, sometidos a condiciones de trabajo bastante extremas (2650 ºC durante 15 s), se observó que pueden realizarse entre 200-250 medidas antes de que se presente un desgaste apreciable de los mismos.

III.4.7. Conclusiones

Se ha realizado la primera determinación elemental conocida sobre un *DUS*. Para ello ha debido resolverse el problema de sensibilidad que se presenta si se deposita directamente la orina sobre papel de filtro de forma análoga a como se deposita la sangre pues, debido a la elevada difusión de la orina sobre el papel, la concentración del analito por unidad de superficie resulta demasiado pequeña.

Para resolver este problema se ha desarrollado un nuevo sistema de deposición de muestra mediante el uso de papel clínico precortado (es decir, de pequeño tamaño) que se coloca sobre una superficie hidrófoba que limita la difusión de la orina. De esta forma, por adición de un volumen adecuado de muestra, se obtienen *DUS* que están *saturados* en orina. Aunque esta metodología es menos sencilla que la deposición directa, sigue siendo compatible con protocolos de recogida de muestras en el hogar, pues basta disponer de pipetas Pasteur desechables para dispensar el volumen requerido con suficiente exactitud.

Con este sistema de muestreo y aprovechando las capacidades polielementales de la técnica de *GF-AAS* de alta resolución con fuente continua, se ha realizado la determinación simultánea de molibdeno y titanio en orina, dos elementos cuya determinación puede ser relevante para la monitorización del funcionamiento de los implantes metálicos. Salvo en la deposición de la muestra, las determinaciones se han realizado mediante una metodología análoga a la desarrollada para la determinación de plomo en sangre y, aunque la determinación de estos elementos mediante *GF-AAS* dista de ser sencilla, los resultados fueron satisfactorios: buena concordancia con los valores de referencia y valores de DSR por debajo del 10%.

Como única limitación del procedimiento hay que señalar que la sensibilidad para el titanio es insuficiente para cuantificar este elemento en pacientes cuyas prótesis funcionen correctamente, pero alcanza para los niveles de este elemento que se esperan en caso contrario. Además, igual que sucede con la determinación de plomo en sangre, no fue posible realizar el calibrado con patrones acuosos siendo preciso utilizar patrones emparejados.

En cuanto al comportamiento de la orina sobre el papel de filtro, se ha encontrado que en condiciones de difusión libre hay un severo efecto cromatográfico para ambos elementos que, además, es opuesto: la concentración de titanio disminuye del centro al borde y la de molibdeno, al revés. Por el contrario, con el sistema de muestreo propuesto (con una difusión limitada de la orina), no se han encontrado diferencias significativas en la concentración de ambos elementos en las distintas zonas del papel de filtro precortado, siempre con el nivel de discriminación espacial de los pequeños discos troquelados y evitando que éstos incluyan el borde del *DUS*.

Los resultados obtenidos sugieren que: 1) mediante esta forma de trabajo se puede determinar un número elevado de elementos sobre los DUS, muchos de ellos con menos dificultades que los estudiados en este trabajo; y 2) la determinación simultánea de unos pocos elementos que tengan líneas atómicas próximas mediante *GF-AAS* de alta resolución

con fuente continua parece perfectamente posible. La posibilidad de realizar determinaciones multielementales sin esta limitación se estudiará en el siguiente apartado.

III.4.8. Bibliografía

[1] A. Sarmiento-González, J.R. Encinar, J.M. Marchante-Gayón, A. Sanz-Medel. Titanium levels in the organs and blood of rats with a titanium implant, in the absence of wear, as determined by double-focusing ICP-MS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2009, 393, 335–343.

[2] G. Schwarz. Molybdenum cofactor biosynthesis and deficiency. *Cell. Mol. Life Sci.*, 2005, 62, 2792–2810.

[3] R.R. Mendel, F. Bittner. Cell biology of molybdenum. *Biochim. Biophys. Acta*, 2006, 1763, 621–635.

[4] C.A. Burtis, E.R. Ashwood, Eds. Tietz textbook of Clinincal Chemistry, Third Edition. W.B. Saunders, Philadelphia, 1999.

[5] Y. Nuevo Ordóñez, M. Montes-Bayón, E. Blanco-González, J. Paz-Jiménez, J.M. Tejerina-Lobo, J.M. Peña-López, A. Sanz-Medel. Metal release in patients with total hip arthroplasty by DF-ICP-MS and their association to serum proteins. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2009, 24, 1037–1043.

[6] J.J. Jacobs, A.K. Skipor, P.A. Campbell, N.J. Hallab, R.M. Urban, H.C. Amstutz. Can metal levels be used to monitor metal-on-metal hip arthroplasties? *J. Arthroplasty*, 2004, 19, 59–65.

[7] M.S. Patton, T.D.B. Lyon, G.P. Ashcroft. Levels of systemic metal ions in patients with intramedullary nails. *Acta Orthop.*, 2008, 79, 820–825.

[8] P.-A. Vendittoli, A. Roy, S. Mottard, J. Girard, D. Lusignan, M. Lavigne. Metal ion release from bearing wear and corrosion with 28 mm and large-diameter metal-on-metal bearing articulations: a follow-up study. *J. Bone Joint Surg. Br.*, 2010, 92, 12–19.

[9] Y. Nuevo Ordóñez, M. Montes-Bayón, E. Blanco-González, J. Paz-Aparicio, J.D. Raimundez, J.M. Tejerina, M.A. Peña, A. Sanz-Medel. Titanium release in serum of patients with different bone fixation implants and its interaction with serum biomolecules at physiological levels. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 401, 2747–2754.

[10] S.S. Leopold, R.A. Berger, L. Patterson, A.K. Skipor, R.M. Urban, J.J. Jacobs. Serum titanium level for diagnosis of a failed, metal-backed patellar component. *J. Arthroplasty*, 2000, 15, 938–943.

[11] J. del Rio, J. Beguiristain, J. Duart. Metal levels in corrosion of spinal implants. *Eur. Spine J.*, 2007, 16, 1055–1061.

[12] D. Schiopu, J. Girard, M. Soenen, N. Krantz, H. Migaud. Metal ions levels measurements for early total hip replacement malfunction diagnosis with “plasma-sprayed ceramic” bearings couple. *Orthop. Traumatol. Surg. Res.*, 2010, 96, 75–79.

[13] M.C. Rizzetti, P. Liberini, G. Zarattini, S. Catalani, U. Pazzaglia, P. Apostoli, A. Padovani. Loss of sight and sound. Could it be the hip? *Lancet*, 2009, 373, 1052.

[14] Medicine and Healthcare products Regulatory Agency. Medical Device Alert Ref: MDA/2012/008. http://www.mhra.gov.uk/Publications/Safetywarnings/MedicalDeviceAlerts/CON155761 (last accessed 29/03/2014).

[15] M. Yoshida, H. Hattori, S. Ota, K. Yoshihara, N. Kodama, Y. Yoshitake, M. Nishimuta. Molybdenum balance in healthy young Japanese women. *J. Trace Elem. Med. Bio.*, 2006, 20, 245–252.

[16] G. Xie, C. Wang, J. Sun, G. Zhong. Tissue distribution and excretion of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles. *Toxicol. Lett.*, 2011, 205, 55–61.

[17] B.S. Iversen, C. Menné, M.A. White, J. Kristiansen, J.M. Christensen, E. Sabbioni. Inductively coupled plasma mass spectrometric determination of molybdenum in urine from a Danish population. *Analyst*, 1998, 123, 81–85.

[18] P. Heitland, H.D. Köster. Fast, simple and reliable routine determination of 23 elements in urine by ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2004, 19, 1552–1558.

[19] E. Sievers, U. Schleyerbach, J. Schaub. Molybdenum in infancy: methodical investigation of urinary excretion. *J. Trace Elem. Med. Bio.*, 2001, 15, 149–154.

[20] M. Zeiner, M. Ovari, G. Zaray, I. Steffan. Selected urinary metal reference concentrations of the Viennese

population - urinary metal reference values (Vienna). *J. Trace Elem. Med. Bio.*, 2006, 20, 240–244.

[21] N.M. Desy, S.G. Bergeron, A. Petit, O.L. Huk, J. Antoniou. Surgical variables influence metal ion levels after hip resurfacing. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2011, 469, 1635–1641.

[22] A. Sarmiento-González, J.M. Marchante-Gayón, J.M. Tejerina-Lobo, J. Paz-Jiménez, A. Sanz-Medel. High-resolution ICP-MS determination of Ti, V, Cr, Co, Ni, and Mo in human blood and urine of patients implanted with a hip or knee prosthesis. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 391, 2583–2589.

[23] I.N.B. Castilho, B. Welz, M.G.R. Vale, J.B. de Andrade, P. Smichowski, A.A. Shaltout, L. Colares, E. Carasek. Comparison of three different sample preparation procedures for the determination of traffic-related elements in airborne particulate matter collected on glass fiber filters. *Talanta*, 2012, 88, 689–695.

[24] U. Kumtabtim, A. Siripinyanond, C. Auray-Blais, A. Ntwari, J.S. Becker. Analysis of trace metals in single droplet of urine by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, 2011, 307, 174–181.

[25] W.H. Hannon, R.J. Whitley, B. Davin, P. Fernhoff, T. Halonen, M. Lavochkin, J. Miller, J. Ojodu, B.L. Therrell. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Blood collection on filter paper for newborn screening programs; approved standard—fifth edition. CLSI document LA4-A5 (ISBN 1-56238-644-1). Clinical and Laboratory Standards Institute, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2007.

[26] P. Timmerman, S. White, S. Globig, S. Lüdtke, L. Brunet, J. Smeraglia. EBF recommendation on the validation of bioanalytical methods for dried blood spots. *Bioanalysis*, 2011, 3, 1567–1575.

[27] H. Blasco, M.-A. Garrigue, A. Vos, C. Antar, F. Labarthe, F. Maillot, C.R. Andres, L. Nadal-Desbarats. Filter paper saturated by urine sample in metabolic disorders detection by proton magnetic resonance spectroscopy. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, 396, 1205–1211.

[28] T.W. McDade, S. Williams, J.J. snodgrass. What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research. *Demography*, 2007, 44, 899–925.

[29] J.C. Rockett, G.M. Buck, C.D. Lynch, S.D. Perreault. The value of home-based collection of biospecimens in reproductive epidemiology. *Environ. Health Perspect.*, 2004, 112, 94–104.

[30] X. Fu, M. Iga, M. Kimura, S. Yamaguchi. Simplified screening for organic acidemia using GC/MS and dried urine filter paper: a study on neonatal mass screening. *Early Hum. Dev.*, 2000, 58, 41–55.

[31] C. Barbas, A. García, L. de Miguel, C. Simó. Evaluation of filter paper collection of urine samples for detection and measurement of organic acidurias by capillary electrophoresis, *J. Chromatogr. B*, 2002, 780, 73–82.

[32] T. Shinka, M. Ohse, Y. Inoue, T. Kuhara. Stability of 5-aminolevulinic acid on dried urine filter paper for a diagnostic marker of tyrosinemia type I. *J. Chromatography B*, 2005, 823, 44–46.

[33] C. Auray-Blais, D. Cyr, K. Mills, R. Giguère, R. Drouin. Development of a filter paper method potentially applicable to mass and high-risk urinary screenings for Fabry disease. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2006, 30, 106.

[34] C. Auray-Blais, D. Cyr, R. Drouin. Quebec neonatal mass urinary screening programme: From micromolecules to macromolecules. *J. Inherit. Metab. Dis.*, 2007, 30, 515–521.

[35] L. Huang, X. Yu, J. Zhang, X. Liu, Y. Zhang, X. Jiao, X. Yu. Metal element excretion in 24-h urine in patients with wilson disease under treatment of d-penicillamine. *Biol. Trace Elem. Res.*, 2011, 146, 154–159.

[36] D. Ryan, K. Robards, P.D. Prenzler, M. Kendall. Recent and potential developments in the analysis of urine: a review. *Anal. Chim. Acta*, 2011, 684, 17–29.

[37] M.F. Boeniger, L.K. Lowry, J. Rosenberg. Interpretation of urine results used to assess chemical exposure with emphasis on creatinine adjustments: a review. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.*, 1993, 54, 615–627.

[38] A.B.P. van Kuilenburg, H. van Lenthe, M. Löffler, A.H. van Gennip. Analysis of pyrimidine synthesis “de novo” intermediates in urine and dried urine filter-paper strips with HPLC-electrospray tandem mass spectrometry. *Clin. Chem.*, 2004, 50, 2117–2124.

[39] Analytik Jena. Comunicación Personal.

[40] T.M. Sørlie, G. Wibetoe. Determination of titanium by slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry with the use of fluoride modifiers. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2003, 376, 721–727.

[41] A. Asfaw, G. Wibetoe. Freon (CHF_3)-assisted atomization for the determination of titanium using ultrasonic slurry sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry (USS-GFAAS): a simple and advantageous

method for solid samples. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, 379, 526–531.

[42] H.-J. Heinrich, R. Matschat. Investigations on Freon-assisted atomization of refractory analytes (Cr, Mo, Ti, V) in multielement electrothermal atomic absorption spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B*, 2007, 62, 807–816.

[43] I. Lopez-Garcia, P. Vinas, R. Romero-Romero, M. Hernández-Córdoba. Liquid chromatography-electrothermal atomic absorption spectrometry for the separation and preconcentration of molybdenum in milk and infant formulas. *Anal. Chim. Acta.*, 2007, 597, 187–194.

[44] E.A. Piperaki, N.S. Thomaidis, I. Demis. Platinum group metals as chemical modifiers for the determination of molybdenum by electrothermal atomic absorption spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, 14, 1901–1906.

[45] D. Barałkiewicz, J. Siepak. Determination of trace amounts of molybdenum in water samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry with multiple injections and cool down step. *Anal. Chim. Acta*, 1997, 353, 85–89.

[46] B. Welz, M. Sperling. Atomic Absorption Spectrometry, Third edition. Wiley-VCH, Weinheim, 1999.

[47] S.R. de Oliveira, J.A.G. Neto. Evaluation of Bi as internal standard to minimize matrix effects on the direct determination of Pb in vinegar by graphite furnace atomic absorption spectrometry using Ru permanent modifier with co-injection of Pd/$Mg(NO_3)_2$. *Spectrochim. Acta Part B*, 2007, 62, 1046–1050.

[48] F. Li, J. Zulkoski, D. Fast, S. Michael. Perforated dried blood spots: a novel format for accurate microsampling. *Bioanalysis*, 2011, 3, 2321–2333.

[49] Y. Inoue, M. Ohse. Prenatal diagnosis of methylmalonic aciduria by measuring methylmalonic acid in dried amniotic fluid on filter paper using gas chromatography-mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 400, 1953–1958.

[50] S. Tanna, G. Lawson. Analytical methods used in conjunction with dried blood spots. *Anal. Methods*, 2011, 3, 1709–1718.

III.5. Análisis directo multielemental de orina en los *DUS* mediante *LA-ICP-MS*.

En el Apartado III.4 se ha demostrado que se pueden retener muestras de orina en los papeles de filtro registrados por la *Food and Drug Administration* sin más que depositar un fragmento medido del mismo encima de una superficie hidrófoba y dispensar un volumen adecuado de orina sobre dicho trozo de papel de filtro. Los *PS-DUS* así obtenidos contienen una cantidad de analito adecuada para realizar las determinaciones mediante *GF-AAS* y presentan la suficiente homogeneidad como para poder obtener los resultados de diversas partes de los mismos (círculos interiores de 3.2 mm de diámetro).

El número de elementos contenidos en la orina que pueden tener interés clínico es elevado [1,2] y, aunque en el citado apartado se logró la determinación simultánea de dos de ellos, las posibilidades multielementales de la técnica de *GF-AAS* con fuente continua de alta resolución son muy limitadas (dos o tres elementos a lo sumo), tal como se expuso en el Apartado III.3. No cabe duda de que puede obtenerse un mejor aprovechamiento de los *PS-DUS* si se pueden utilizar sobre ellos técnicas de análisis realmente multielementales.

En este capítulo se aborda la determinación simultánea de varios elementos en orina depositada en un *PS-DUS* mediante *LA-ICP-MS*, que es una poderosa herramienta multielemental especialmente apropiada para el análisis directo de este tipo de muestra, sin la necesidad de introducir ningún paso de extracción/digestión previo a las medidas [3].

A diferencia de otras partes de esta Memoria que persiguen obtener resultados analíticos para problemas clínicos concretos y perfectamente definidos, este apartado tiene más bien un carácter exploratorio sobre las posibilidades de obtener información multielemental a partir de los *PS-DUS* mediante *LA-ICP-MS* y, en este sentido, la elección de los elementos objeto de estudio conjuga intereses clínicos, analíticos y de conveniencia.

Desde el punto de vista clínico, varios de dichos elementos (berilio, cadmio, níquel, plomo, estaño o talio) pueden revelar la exposición a metales y metaloides tóxicos [4]; el cobalto y el vanadio pueden detectar la degradación de prótesis al igual que el molibdeno y el titanio estudiados en el Apartado III.4 [5]; el bismuto y el antimonio pueden utilizarse para monitorizar los niveles de metales o metaloides involucrados en tratamientos farmacéuticos como el de las úlceras pépticas [6] o la leishmaniasis [7]. Finalmente el contenido en cobre de la orina puede utilizarse en el diagnóstico de la enfermedad de Wilson [8], lo que se estudiará con detalle en el Apartado III.6.

Con criterio analítico se han seleccionado elementos que cubren todo el intervalo típico de masas y presentan diferentes características físico-químicas (puntos de ebullición que van desde los 767 ºC del cadmio a los 3407 ºC del vanadio y potenciales de ionización que oscilan entre los 6.1 eV del talio y los 9.0 eV del cadmio) a fin de comprobar la versatilidad del procedimiento desarrollado pero, como factor de conveniencia, se han evitado en este primer trabajo aquellos elementos para los que su determinación por *LA-ICP-MS* requeriría un desarrollo metodológico muy específico o complejo como, por ejemplo, el titanio y el arsénico debido a potenciales solapamientos isobáricos.

En definitiva, el objetivo final de este estudio es el desarrollo de un método de análisis multielemental de *PS-DUS* lo suficientemente versátil como para que pueda ser adaptado a las necesidades concretas que requiera una situación clínica determinada y que, de acuerdo con los objetivos generales de esta Memoria, sea compatible con la preparación de muestras sin supervisión, como puede ser por el propio paciente en el hogar.

En lo referente a la estrategia de muestreo, el punto de partida será mantener el método de preparación de los *PS-DUS* desarrollado en el Apartado III.4 para la determinación de molibdeno y titanio mediante *GF-AAS* con fuente continua ya que, de esta forma, se ampliará el número de técnicas analíticas que se pueden utilizar sobre *PS-DUS* preparados de forma idéntica. Adicionalmente, se aprovechará la elevada capacidad de resolución espacial que proporciona la técnica de *LA-ICP-MS* para obtener mayor información sobre la distribución sobre la superficie del papel de filtro de los analitos contenidos en la orina.

En cuanto a las medidas mediante *LA-ICP-MS*, se prestará especial atención al calibrado, tradicionalmente considerado como uno de los aspectos más críticos de las determinaciones realizadas mediante esta técnica [9,10]. En este sentido, aunque se pretende desarrollar un sistema de medida lo más sencillo posible, se hará uso sistemático de un patrón interno para corregir las posibles variaciones que se pueden producir en el proceso de ablación de la muestra.

Hasta el momento sólo se conoce otro intento de análisis multielemental de orina retenida en papel de filtro, el de Kumtabtim *et al*. [11] que utilizaron también la técnica de *LA-ICP-MS*. Sin embargo, como se explicó en el Apartado III.4, la gran difusión de la orina en un medio tan hidrofílico como el papel de filtro provocaba una falta de sensibilidad que no permitía la obtención de señal para ninguno de los elementos estudiados; consecuentemente, cambiaron dicho soporte de la orina por teflón que, aunque resuelve los problemas analíticos, resulta difícilmente trasladable a la práctica clínica cotidiana y no parece compatible con el requisito de preparación de muestras sin supervisión y fácil envío de las mismas al laboratorio.

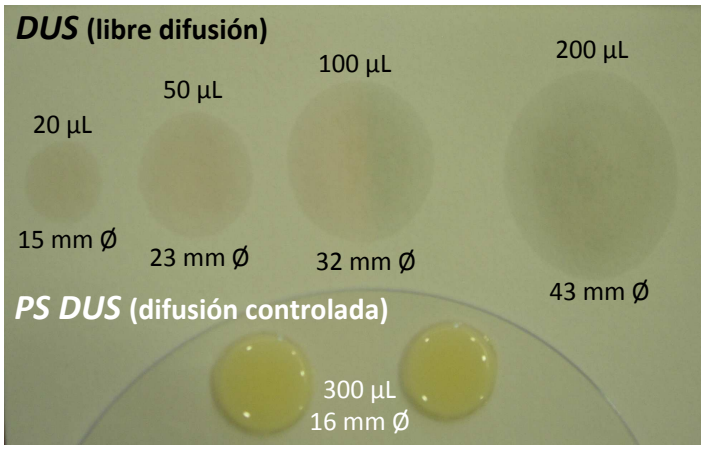
III.5.1. Estudio detallado sobre la distribución de la orina en el papel de filtro.

Las características de la deposición de orina sobre papel de filtro ya se han discutido extensamente en el Apartado III.4. Dado que la técnica *PS-DUS* parece resolver los problemas de sensibilidad y homogeneidad que se presentan en los *DUS* de difusión libre y que los *PS-DUS* resultan relativamente sencillos de preparar, esta fue la técnica de deposición de muestra que se utilizó para el análisis multielemental en orina mediante *LA-ICP-MS*.

La única modificación que se introdujo fue que, en vez de utilizar papeles de filtro cortados de forma rectangular (casi cuadrados), se prefirió utilizar un troquelador manual, que permite preparar estos fragmentos con geometría circular y, sobre todo, con un tamaño más reproducible. Los troqueladores automáticos empleados habitualmente para preparar los *DBS* proporcionan tamaños de disco (3.2, 4.7 o 6.0 mm de diámetro) que son demasiado pequeños para el propósito de este trabajo, esto es, la retención de un volumen suficiente de orina que pueda depositarse con una pipeta Pasteur con relativa facilidad.

En consecuencia, se utilizó un troquelador manual que proporciona trozos de papel de filtro circulares de 16 mm de diámetro. En estas condiciones el volumen máximo de orina que es capaz de retener por tensión superficial es de unos 300 µL. Aunque este volumen es inferior al depositado sobre los trozos rectangulares de papel de filtro utilizados en el Apartado III.4 (500 µL), el contenido de orina por unidad de superficie en ambos *PS-DUS* es prácticamente el mismo, de aproximadamente 150 µL de orina cm^{-2}. Como se indicó en el Apartado III.4, esto supone una concentración entre 10-12 veces mayor que en los *DUS* de difusión libre y puede apreciarse visualmente en la Figura III.5.1.

Figura III.5.1. Comparación visual de la superficie ocupada por la orina en papel de filtro bajo condiciones de libre difusión y de difusión controlada.



En el Apartado III.4 se demostró que la deposición de la orina mediante la técnica de los *PS-DUS* ofrece una distribución del molibdeno y del titanio suficientemente homogénea en el área ocupada, quedando sólo una duda razonable sobre si la homogeneidad se mantiene en el límite de dicha área. Dado que la medida mediante *GF-AAS* se realizaba sobre círculos troquelados de 3.2 mm de diámetro no se pudieron hacer estudios de distribución más detallados que, en cambio, se realizan con facilidad si el sistema de medida es *LA-ICP-MS*, técnica con una elevadísima resolución espacial. Aprovechando esta característica se realizó un estudio más profundo de la distribución de los distintos analitos investigados sobre toda la superficie del papel ocupado por la orina depositada, tanto en los *PS-DUS* como en los *DUS* de libre difusión.

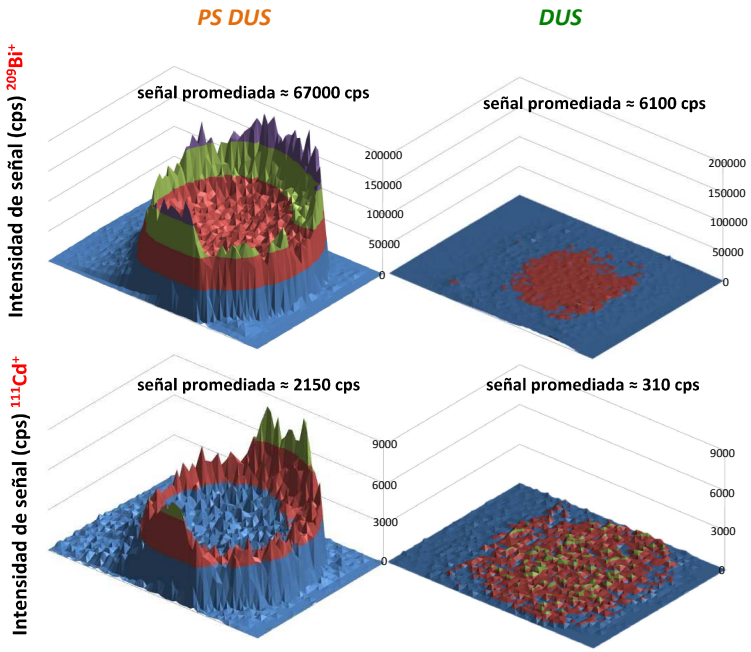
Para ello se preparó una muestra de orina reforzada hasta una concentración de 100 µg L^{-1} para todos los analitos de interés. Los *PS-DUS* se prepararon pipeteando 300 µL de esta orina y los *DUS* de libre difusión pipeteando 25 µL de la misma, que es el volumen que ocupa una superficie semejante a la de los *PS-DUS* como puede apreciarse en la Figura III.5.1.

Cuando se trata de obtener resultados cuantitativos mediante *LA-ICP-MS* es muy recomendable el uso de un patrón interno para corregir diferencias en la eficiencia de la ablación y derivas de sensibilidad [12]. Por ello, a la disolución de los analitos se añadió también platino, en la misma concentración que aquéllos. Las condiciones de utilización del patrón interno se discutirán con detalle en el Apartado III.5.3.

A continuación se obtuvo el mapa de distribución mediante *LA-ICP-MS* escaneando el área completa de ambos tipos de *DUS* mediante la ablación de líneas adyacentes con el láser de 400 µm de diámetro de haz y utilizando unos parámetros de trabajo (velocidad de barrido del láser y de adquisición de datos por parte del *ICP-MS*) que proporcionan píxeles cuadrados en el mapa de distribución final [13]. Con objeto de detectar simultáneamente todos los elementos de interés, en estas medidas se utilizó una resolución media (R≈4000) del sistema de detección.

En la Figura III.5.2 se presentan los mapas de distribución obtenidos para el bismuto y el cadmio, tanto en los *PS-DUS* como en los *DUS* de libre difusión, que resultan representativos del comportamiento de todos los elementos investigados.

Figura III.5.2. Mapas de distribución del bismuto y del cadmio en los *PS-DUS* y los *DUS* de libre difusión.



Para comparar las sensibilidades se indican las señales promediadas obtenidas en un área de 9x9 mm en el centro del mapa. La escala de color de los *DUS* se ha modificado para mejorar su legibilidad.

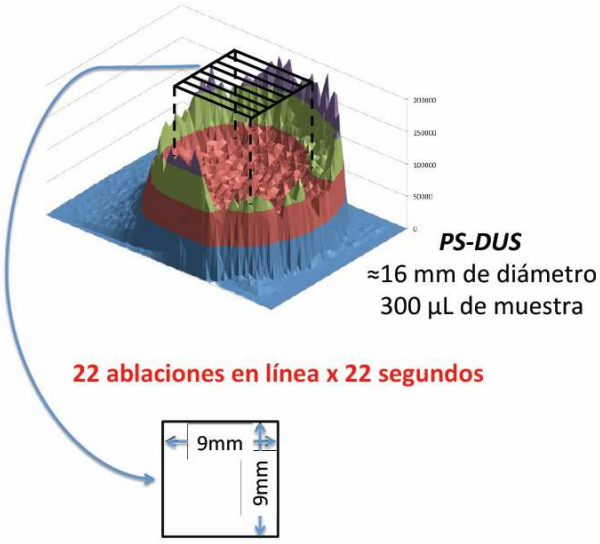
Si la deposición se realiza sobre los *PS-DUS*, en todos los casos la concentración del analito es más elevada en el borde del mismo, tal como se había intuido en el Apartado III.4. También se corrobora que existe una extensa zona central de la gota en la que la distribución de los analitos parece bastante homogénea.

En el caso de los *DUS* de libre difusión, los resultados que proporciona la técnica de *LA-ICP-MS* también son acordes con los obtenidos para el molibdeno y el titanio mediante *GF-AAS*. En primer lugar, es evidente que la distribución espacial de los distintos analitos es diferente de unos a otros; por ejemplo, el bismuto se acumula en el centro del *DUS* sin llegar a alcanzar sus bordes, mientras que el cadmio muestra una distribución más homogénea sobre toda la superficie. Además, en todos los casos, la señal obtenida a partir de los *DUS* es sensiblemente inferior a la que proporcionan los *PS-DUS*; si se mide en la zona central de ambos papeles de filtro, la señal es entre 8 y 11 veces menor en los *DUS* que en los *PS-DUS*, dependiendo del elemento estudiado.

Estos resultados corroboran inequívocamente los obtenidos en el Apartado III.4 sobre la prevalencia de la técnica de los *PS-DUS* sobre la de los *DUS* de libre difusión como sistema de recogida de la orina sobre papel de filtro.

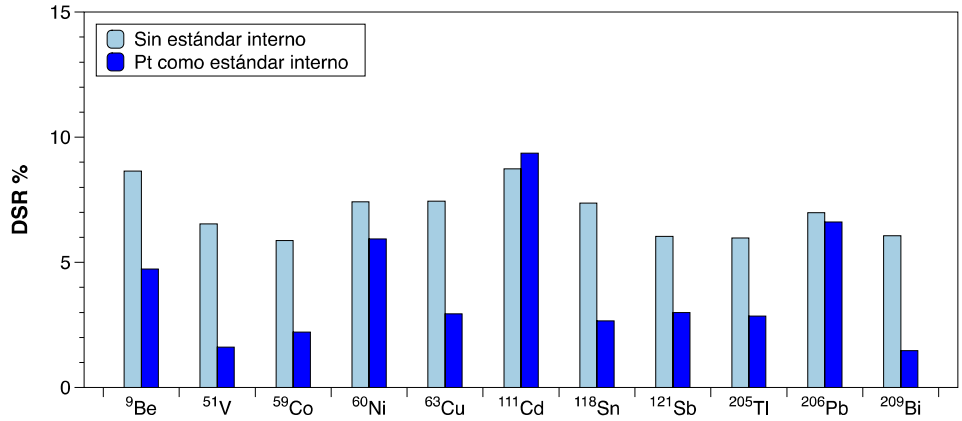
Se realizó un último estudio sobre la homogeneidad de la zona central de los *PS-DUS* para los distintos analitos estudiados. Para ello se seleccionó una superficie de 9x9 mm en el centro del *PS-DUS* preparado por deposición de la orina reforzada y se realizó la ablación y consiguiente medida mediante *ICP-MS* a lo largo de 22 líneas de dicha superficie, tal como se muestra en la Figura III.5.3.

Figura III.5.3. Zona de medida del *PS-DUS* para el estudio de homogeneidad.



Utilizando los valores de señal promedio obtenidos en las 22 líneas para cada uno de los analitos se calculó la DSR de aquéllos, valor que es una indicación de la variación del contenido de los distintos elementos en las diferentes líneas. Los resultados obtenidos se presentan en la Figura III.5.4.

Figura III.5.4. Desviación estándar relativa del valor promedio de las 22 líneas del *PS-DUS* medidas.



Los valores de DSR obtenidos para todos los elementos estudiados se mantuvieron por debajo del 10% que, en principio, parece adecuado para demostrar una suficiente homogeneidad de la zona central del *PS-DUS*. El uso del platino como patrón interno corrobora lo anterior, ya que si se estudia la relación señal del analito/señal del platino, los valores de DSR disminuyen en casi todos los casos de forma importante, con valores que no superan el 5%, lo que es difícil de mejorar para cualquier aplicación mediante la técnica *LA-ICP-MS*, como consecuencia de la naturaleza irreproducible del proceso de ablación [14]. Estos resultados indican que buena parte de la imprecisión de las medidas de cada elemento se deben, no a la falta de homogeneidad de la zona central del *PS-DUS*, sino a cambios en los procesos de

ablación por el láser y de medida por *ICP-MS* que son parcialmente corregidos por el uso del patrón interno.

En conclusión, los experimentos desarrollados en este apartado y en el anterior demuestran que la técnica del *PS-DUS* resulta perfectamente adecuada para la finalidad prevista en estos trabajos, es decir, potenciales aplicaciones clínicas (sistema de criba, estudios epidemiológicos, etc.). En lo relativo al paciente es bastante sencilla, pues únicamente implica la necesidad de depositar un volumen conocido sobre el papel de filtro cortado previamente y depositado sobre una superficie hidrófoba; no debe plantear problemas incluso para la recogida por el propio paciente siempre que se le proporcionen unas mínimas instrucciones como, por ejemplo, un tríptico con imágenes. En el aspecto analítico, los *PS-DUS* presentan una reproducibilidad y homogeneidad suficientes como para obtener resultados de una calidad adecuada a los fines previstos, aunque probablemente no sea la mejor opción si se desea obtener resultados de la máxima exactitud.

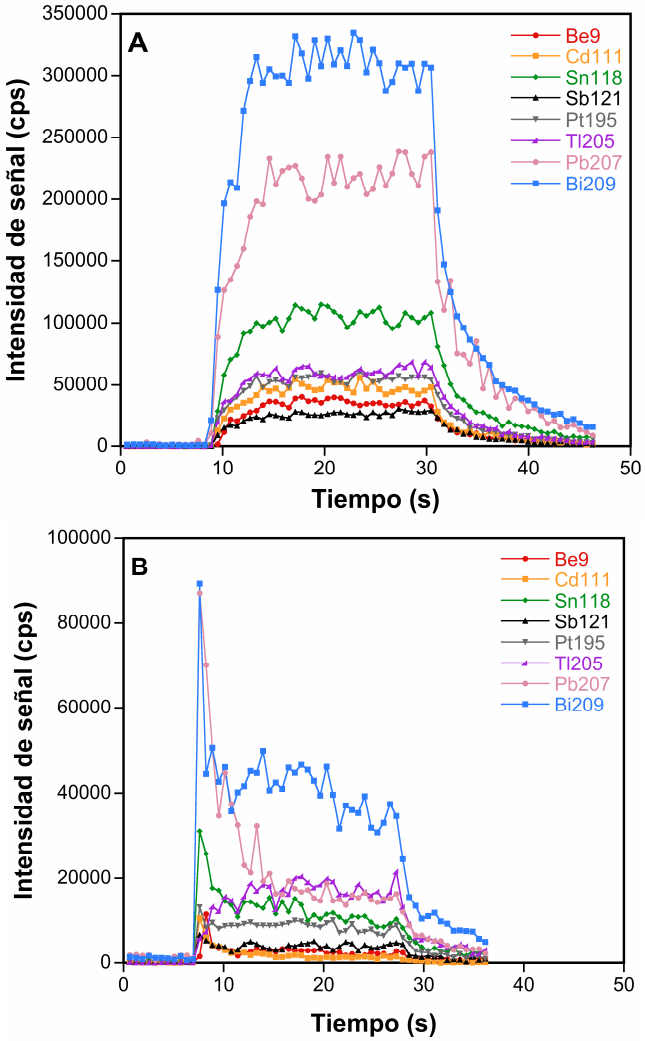
III.5.2. Condiciones para realizar la ablación.

Las condiciones de medida de ambos instrumentos (resumidas en la Tabla II.6) se ajustaron para lograr la máxima sensibilidad, robustez del plasma y una mínima influencia de interferencias sobre las señales de los analitos. Por el lado del *ICP-MS*, se consideró cuidadosamente la selección de los isótopos monitorizados y la resolución de masas empleada. Se utilizó el modo de baja resolución (R≈300) siempre que fue posible para maximizar la intensidad de las señales. Sin embargo, la medida de vanadio, cobalto, níquel y cobre necesitó resolución media (R≈4000) para poder superar las significativas interferencias poliatómicas que pueden afectar a dichos elementos y que se muestran en la citada tabla. La medida de ambos conjuntos de analitos se realizó en dos réplicas diferentes, puesto que el cambio del modo de resolución se produce en un intervalo de tiempo demasiado largo (2 s por cambio) como para ser integrado en una única medida (típicamente, de 40 s).

Respecto de los parámetros del láser, las mejores condiciones para los analitos de interés se optimizaron diariamente mediante la ablación de un papel de filtro impregnado con un patrón emparejado, fortificado con 50 µg L^{-1} de todos los analitos de interés. En cuanto a la estrategia de ablación utilizada para la obtención de resultados cuantitativos, dicha ablación se realizó siempre dentro del área de 9x9 mm en el centro de los discos de papel de filtro precortados (ver la Figura III.5.3), donde la homogeneidad de la distribución de los analitos está asegurada.

Por otra parte, como se deduce de la Figura III.5.5, parece que la mayoría de los analitos se acumulan en la superficie del papel de filtro. En efecto, se obtienen mejores sensibilidades (de 10 a 20 veces mayores, dependiendo del analito) cuando la ablación se realiza en líneas a lo largo de la superficie del papel, con una alta velocidad de traslación (400 µm s^{-1}) de forma que penetra únicamente unos 20 µm de profundidad (modo *raster*), que si se realiza la ablación en un único punto (modo *drill*), que tenía que llevarse a cabo a una menor ritmo de paso (5 Hz en lugar de los 20 Hz del modo *raster*) para poder obtener una señal de duración similar sin llegar a perforar el papel de filtro de 400-500 µm de grosor.

Figura III.5.5. Señales de *LA-ICP-MS* obtenidas a partir de orina fortificada preparada como *PS-DUS*.



Medidas en baja resolución (R≈300). A) Ablación en línea (modo *raster*). B) Ablación en un único punto (modo *drill*).

Además, la ablación de líneas también permite minimizar posibles inhomogeneidades en los *PS-DUS* [15] por lo que, consecuentemente, los resultados para cada muestra o patrón fueron la media de las señales obtenidas al ablacionar tres líneas en el centro de cada espécimen *PS-DUS*.

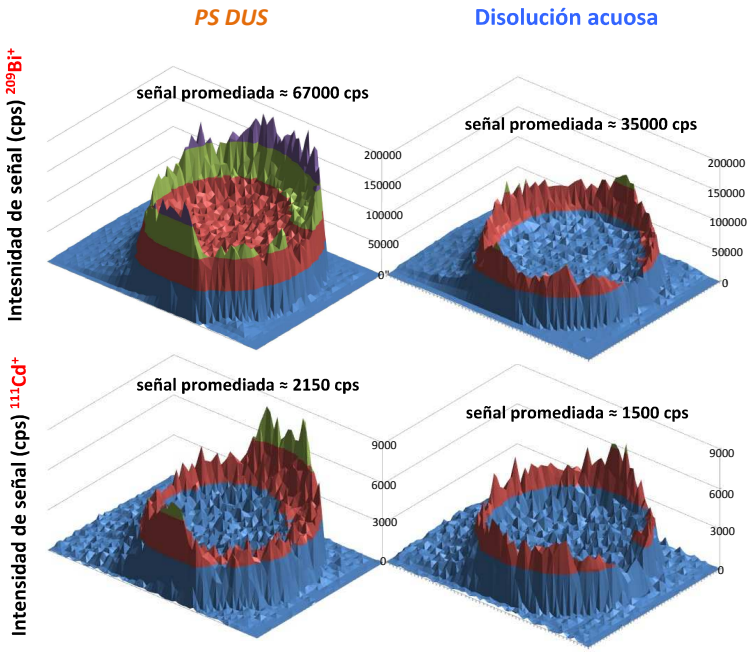
III.5.3. Calibrado.

El calibrado está considerado como uno de los puntos más críticos en las determinaciones elementales mediante *LA-ICP-MS* [9,10]. En primer lugar, se estudió la estrategia más sencilla, es decir, realizar la calibración mediante disoluciones multielementales de patrones acuosos de concentraciones conocidas. Estas disoluciones se depositaban sobre el papel de filtro precortado, de la misma forma que la orina cuando se preparan los *PS-DUS*.

Los resultados no fueron satisfactorios pues el comportamiento de los analitos cuando se depositan sobre el papel de filtro como disoluciones acuosas resultó significativamente diferente al que presentan en la orina. En efecto, para todos los analitos estudiados, las

señales obtenidas a partir de los papeles de filtro impregnados en disoluciones acuosas eran sensiblemente inferiores a los obtenidos para los *PS-DUS*. Como ejemplo, en la Figura III.5.6 se presentan las señales correspondientes al bismuto y al cadmio tras deposición en el papel de filtro de 300 µL de orina reforzada y del mismo volumen de disolución acuosa multielemental; la concentración en ambos casos era de 100 µg L^{-1} para cada analito.

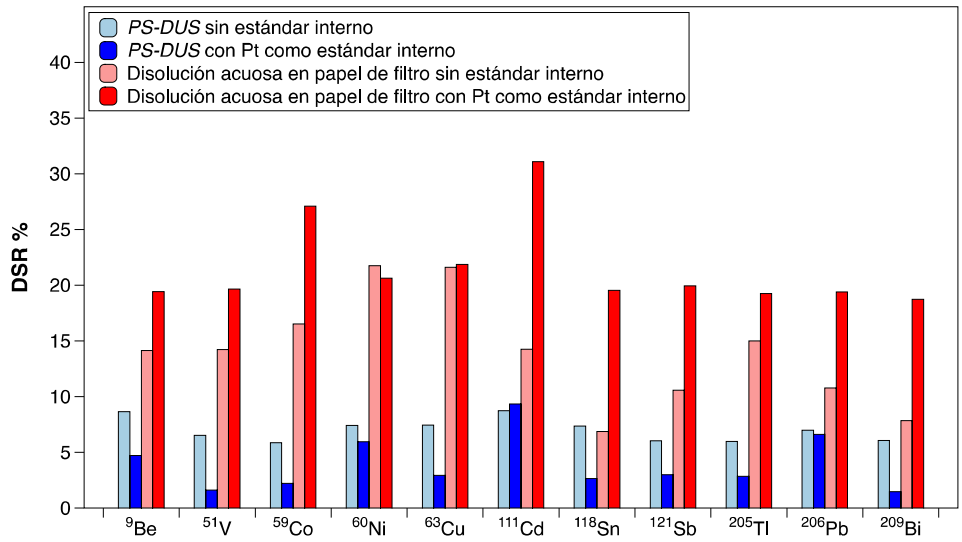
Figura III.5.6. Mapas de distribución del bismuto y del cadmio en los *PS-DUS* y depositados en el papel de filtro como disolución acuosa.



Para comparar las sensibilidades se indican las señales promediadas obtenidas en un área de 9x9 mm en el centro del mapa.

Aunque este comportamiento ya invalida a los patrones acuosos para realizar el calibrado de las muestras de orina, además los discos que contienen una disolución multielemental de patrones acuosos parecen presentar una distribución más heterogénea de los analitos sobre la superficie del papel. En efecto, al realizar un estudio de la homogeneidad de la zona central de los papeles de filtro impregnados con la disolución acuosa (100 µg L^{-1} para los distintos elementos investigados), de forma idéntica a la diseñada para los *PS-DUS* que se ha esquematizado en la Figura III.5.3, se obtuvieron los resultados de DSR que se presentan en la Figura III.5.7, en la que también se han incluido los de los *PS-DUS* ya mostrados en la Figura III.5.4 con objeto de poder realizar la comparación más fácilmente.

Figura III.5.7. Desviación estándar relativa del valor promedio de las 22 líneas medidas en los *PS-DUS* y en los papeles de filtro con disolución acuosa.



Para casi todos los elementos estudiados los valores de DSR son sensiblemente mayores cuando se deposita una disolución acuosa de los mismos sobre el papel de filtro que cuando se coloca la misma concentración de los analitos en orina. El bismuto, y sobre todo el estaño, serían las excepciones más evidentes con valores de DSR semejantes en ambos casos, mientras que el cobre y el níquel prácticamente triplican los valores de DSR cuando se depositan en una disolución acuosa con relación a cuando se prepara un *PS-DUS*.

Los valores de la Figura III.5.7 también indican que los distintos analitos depositados como disolución acuosa en el papel de filtro presentan pautas diferentes en su distribución sobre el mismo (valores de DSR que oscilan entre el 7-22% aproximadamente) lo que contrasta con el comportamiento más regular de los mismos analitos en los *PS-DUS* (valores de DSR entre el 6-9% aproximadamente). A mayor abundamiento, mientras el uso del platino como estándar interno resultaba claramente beneficioso en los *PS-DUS*, en el caso de la deposición de disoluciones acuosas su utilización es perjudicial salvo en los casos del cobre y del níquel que son los únicos analitos que mantienen valores de DSR semejantes con y sin patrón interno. Este comportamiento puede atribuirse a una distinta distribución sobre el papel de filtro del platino y de los otros elementos.

Calibrado mediante patrones emparejados con adición de un patrón interno.

Como consecuencia de todo lo anterior se desestimó la calibración externa con patrones acuosos y, con objeto de solventar los efectos de matriz, se optó por utilizar curvas de calibrado basadas en patrones emparejados (*matrix-matched standards*). Para este caso concreto la preparación de dichos patrones no presenta ninguna dificultad ya que existen materiales de referencia comerciales de la misma matriz (por ejemplo, el *Clincheck Urine Control* utilizado en este trabajo o el *Seronorm Trace Element Urine*). Alternativamente, como se indicó en el Apartado III.4.5, es relativamente simple para un laboratorio clínico obtener muestras de orina de individuos sanos con concentraciones normales de distintos elementos traza y fortificarlas con las concentraciones apropiadas de los analitos de interés. La preparación de estos patrones emparejados para la calibración está descrita en el Apartado II.4.3.

Como ya se ha indicado anteriormente, el uso de un patrón interno es muy recomendable en las medidas cuantitativas mediante *LA-ICP-MS*. Esto es especialmente importante cuando el

montaje experimental obliga a abrir y cerrar la cámara de ablación para cargar las muestras o los estándares a lo largo del proceso de medida [16].

Dado que el patrón interno debe ser un elemento que esté presente en todas las muestras y estándares y que presente en ellos la misma distribución espacial que los analitos, la opción más sencilla es seleccionar un componente principal de la matriz. Por ejemplo, el carbono es una posibilidad para aplicaciones biológicas [12], pero su contenido no puede asumirse que sea constante en todas las muestras de orina (por lo que debería determinarse previamente) y su comportamiento como patrón interno resulta controvertido ya que se ha demostrado que, al contrario que la mayoría de analitos, el carbono ablacionado se transporta en dos fases diferentes [17].

Alternativamente se puede adicionar a las muestras y estándares un patrón interno que debe ser un elemento que no se encuentre presente en ellas, o lo esté en cantidades no significativas. Para este trabajo se utilizó el platino, elemento que fue escogido por encontrarse prácticamente ausente en muestras de orina y no sufrir interferencias espectrales teniendo en cuenta la composición típica de dicha matriz. Ahora bien, la forma de adicionar el patrón interno debe ser congruente con la finalidad perseguida en este trabajo que implica una recogida de muestra sencilla para la preparación de los *PS-DUS*. Como se ha descrito en el apartado I.2.5, Abu-Rabie ha descrito tres aproximaciones distintas para el caso de los *DBS* [18]:

1) adición del patrón interno a la muestra antes de la deposición en el papel de filtro.

2) uso de discos de papel de filtro pretratados con el patrón interno.

3) aplicación del patrón interno al *DBS* (en nuestro caso al *PS-DUS*) con posterioridad a la deposición en el mismo de la muestra.

Evidentemente, la primera opción sería la preferida desde el punto de vista analítico, ya que asegura que el patrón interno se integra completamente en la matriz de orina antes de la deposición en el papel de filtro. Sin embargo, esta posibilidad no es compatible con la recogida de los *PS-DUS* en un contexto sin supervisión (como por el propio paciente en el hogar) ya que la adición del patrón interno se tendría que realizar a la muestra líquida en el laboratorio. El uso de papeles de filtro pretratados con el patrón interno solventa esta dificultad, pero complica la logística y el coste, especialmente cuando se van a llevar a cabo múltiples estudios, en distintos centros y/o distintos compuestos. Por lo tanto, se eligió la última opción por ser la más sencilla que mantiene intactas las ventajas de preparación citadas para los *PS-DUS*.

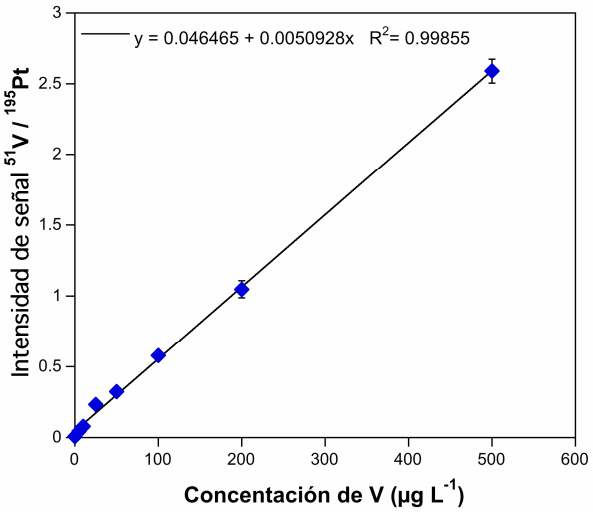
La aplicación del patrón interno sobre los especímenes *PS-DUS* una vez que estos han sido enviados al laboratorio de análisis puede realizarse de diferentes maneras. En un trabajo dedicado a la cuantificación de dos compuestos farmacéuticos en *DBS*, tras la extracción de los compuestos, el patrón interno se aplicó al *DBS* previamente a la extracción utilizando un sistema de *spray* piezoeléctrico [19]. En este trabajo, se ha ensayado una metodología similar, aunque menos sofisticada, consistente en la aplicación del patrón interno usando pipetas calibradas, método que podría utilizarse en cualquier laboratorio de análisis. El procedimiento, que se ha descrito en el Apartado II.4.3, consiste en depositar sobre los *PS-DUS* ya preparados y secos 300 µL de una solución de 100 µg de Pt L^{-1} y dejar que se seque de nuevo a temperatura ambiente durante al menos cuatro horas.

Para validar esta metodología de trabajo, se compararon los resultados obtenidos mediante la misma en el análisis de un material de referencia certificado (*Clincheck Urine Control Level II*) con los que se obtienen para la misma muestra añadiendo el patrón interno a la muestra líquida antes de la preparación del *PS-DUS*, que es la mejor opción desde un punto de vista

estrictamente analítico. Ambas determinaciones se realizaron según los procedimientos operativos descritos en el Apartado II.5.6, obteniendo las curvas de calibrado a partir de una muestra de orina fortificada.

Por los dos procedimientos se obtuvieron curvas de calibrado satisfactorias para todos los elementos estudiados cuando la señal de cada uno de ellos se normalizó con la obtenida para el $^{195}Pt^{+}$; las curvas presentan buena linealidad ($R^2 \geq 0.99$) en el rango de concentración de interés (5-500 µg L^{-1}). A modo de ejemplo, en la Figura III.5.8 se muestra la curva de calibrado correspondiente al vanadio.

Figura III.5.8. Curva de calibrado obtenida para el vanadio en orina retenida en un *PS-DUS* al que se ha adicionado posteriormente el patrón interno.



La incertidumbre de los resultados está expresada como intervalo de confianza (95%, n=3 para los valores experimentales obtenidos).

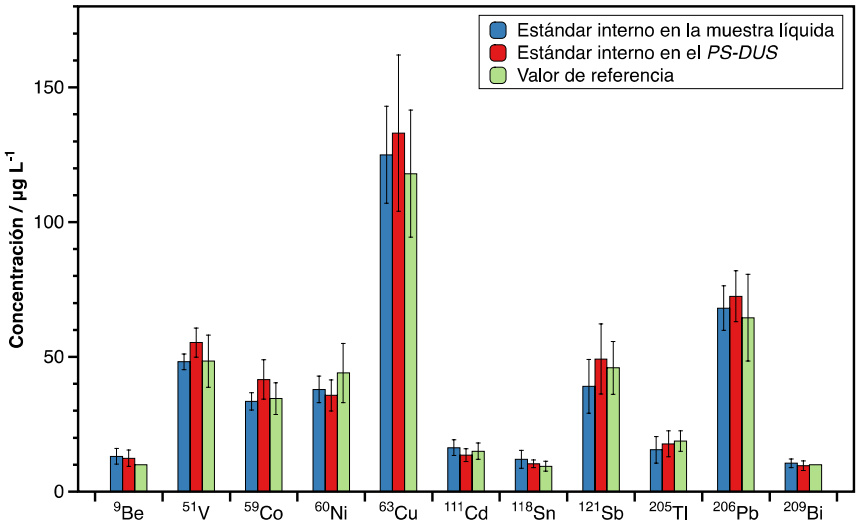
Los resultados obtenidos para los distintos analitos, en tres determinaciones independientes, utilizando las dos formas comentadas de adición del patrón interno se muestran en la Tabla III.5.1 y se representan en la Figura III.5.9.

Tabla III.5.1. Resultados del análisis del *Clincheck Urine Control Level II* con calibrado mediante patrones emparejados.

Curva de calibrado con patrones emparejados			
Analito	**Patrón interno añadido a la orina líquida / µg L^{-1}**	**Patrón interno añadido sobre el *PS-DUS* / µg L^{-1}**	**Valor de referencia / µg L^{-1}**
Be	13.1 ± 2.9	12.4 ± 3.0	10.0*
Bi	10.5 ± 1.6	9.6 ± 1.8	10.0*
Cd	16.3 ± 2.9	13.5 ± 2.4	15.0 ± 3.0
Co	33.5 ± 3.2	41.6 ± 7.3	34.5 ± 5.9
Cu	125 ± 18	133 ± 29	118 ± 23.6
Ni	37.9 ± 4.9	35.7 ± 5.8	44 ± 11
Pb	68.1 ± 8.3	72.5 ± 9.5	64.5 ± 16.1
Sb	39.1 ± 10.0	49.2 ± 13.0	45.9 ± 9.8
Sn	12.0 ± 3.3	10.3 ± 1.4	9.43 ± 1.9
Tl	15.5 ± 4.9	17.7 ± 4.8	18.8 ± 3.8
V	48.2 ± 2.9	55.3 ± 5.4	48.4 ± 9.7

* El material de referencia no contiene berilio ni bismuto, que se adicionaron al mismo tras su reconstitución.
La incertidumbre de los resultados está expresada como intervalo de confianza (95%, n=3 para los valores experimentales obtenidos).

Figura III.5.9. Resultados del análisis del *Clincheck Urine Control Level II* con calibrado mediante patrones emparejados.



La incertidumbre de los resultados está expresada como intervalo de confianza (95%, n=3 para los valores experimentales obtenidos).

Los resultados obtenidos mediante las dos formas de adicionar el patrón interno no muestran diferencias estadísticamente significativas con un nivel de confianza del 95%. Esto prueba la utilidad de la adición del patrón interno "post-muestreo", un protocolo de trabajo que permite la recolección de muestras fuera del ámbito clínico (laboratorio/centro sanitario), de forma que los propios pacientes puedan hacerlo en sus hogares, con unas mínimas instrucciones, y su envío por correo ordinario para el análisis en centros de referencia. En éste, el analista puede seleccionar y añadir el patrón interno más apropiado para la determinación concreta que pretenda desarrollar. Esta estrategia parece también óptima para el archivo de

muestras en biobancos, ya que preserva la utilidad de la muestra para un gran número de estudios.

Más importante, los resultados obtenidos muestran buena concordancia con los valores de referencia lo que demuestra que, como era previsible, se han solventado los efectos de matriz. Ciertamente, los resultados obtenidos a partir del *PS-DUS* (con las dos formas de adicionar el patrón interno) presentan una incertidumbre elevada, con valores aproximadamente entre el 15-20% en la mayoría de los casos y que en alguno supera el 30%. Ahora bien, por un lado estas incertidumbres son semejantes a los valores de DSR del material certificado y, por otro, siguen resultando adecuadas para el propósito de un análisis en un contexto de investigación clínica [20].

Calibrado mediante dilución isotópica

Los resultados obtenidos calibrando mediante dilución isotópica se han considerado tradicionalmente de gran fiabilidad, incluso cuando se presentan cambios de sensibilidad puntuales o inducidos por la matriz. Sin embargo, esta técnica no está libre de inconvenientes como, por ejemplo, ofrecer una capacidad multielemental restringida o la necesidad de seleccionar cuidadosamente la cantidad de trazador enriquecido que se adiciona a la muestra [21].

Dado que nuestro laboratorio tiene la posibilidad de fortificar con un isótopo enriquecido a los elementos cadmio, cobre y plomo, se estudió la posibilidad de realizar el calibrado de los mismos mediante dilución isotópica. Para ello se repitió el esquema de la sección anterior realizando un doble estudio utilizando el material de referencia certificado *Clincheck Urine Control Level II*: adición del trazador sobre el *PS-DUS* una vez seco y adición del trazador sobre la orina y posterior preparación del *PS-DUS*. Los correspondientes procedimientos operativos se han descrito en el Apartado II.5.7.

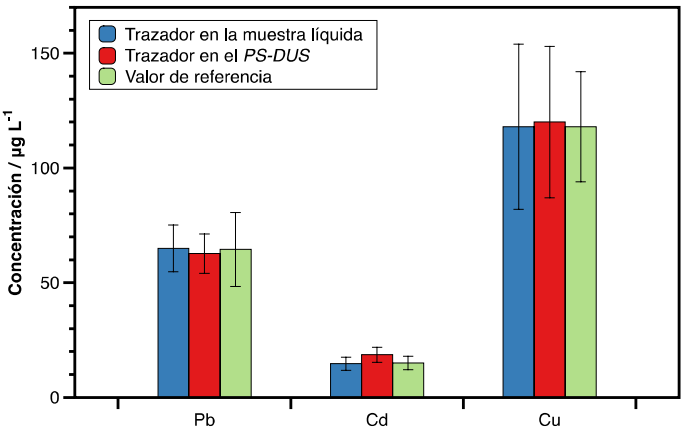
Los resultados obtenidos para los tres analitos estudiados, en tres determinaciones independientes, se presentan en la Tabla III.5.2 y en la Figura III.5.10.

Tabla III.5.2. Resultados del análisis del *Clincheck Urine Control Level II* con calibrado mediante dilución isotópica.

Calibrado por dilución isotópica			
Analito	**Patrón interno añadido a la orina líquida / µg L^{-1}**	**Patrón interno añadido sobre el PS-DUS / µg L^{-1}**	**Valor de referencia / µg L^{-1}**
Cd	14.7 ± 2.9	18.6 ± 3.3	15.0 ± 3.0
Cu	118 ± 36	120 ± 33	118 ± 23.6
Pb	65.0 ± 10.2	62.7 ± 8.6	64.5 ± 16.1

La incertidumbre de los resultados está expresada como intervalo de confianza (95%, n=3 para los valores experimentales obtenidos).

Figura III.5.10. Resultados del análisis del *Clincheck Urine Control Level II* con calibrado mediante dilución isotópica.



La incertidumbre de los resultados está expresada como intervalo de confianza (95%, n=3para los valores experimentales obtenidos).

Como en el caso de la calibración con patrones emparejados, las dos formas de añadir el trazador (mezcla previa con la orina y adición posterior al *PS-DUS*) proporcionan resultados semejantes y acordes con los valores de referencia. Estos resultados demuestran la viabilidad del calibrado mediante dilución isotópica y que el equilibrio entre la muestra y el trazador se consigue también mediante la adición "post-muestreo" de éste, igual que sucedía con el patrón interno en el calibrado mediante patrones emparejados.

Por otra parte, el calibrado por dilución isotópica no mejora la incertidumbre de los resultados obtenidos con relación a cuando se calibra mediante patrones emparejados, por lo que puede descartarse esta etapa como la contribución más importante a dicha incertidumbre. Es más probable que ésta pueda explicarse por la variabilidad inherente a la preparación de los *PS-DUS* y, por lo tanto, debe tenerse en cuenta como una de las limitaciones del método.

Sin embargo, para la determinación de analitos en bajas concentraciones, se pueden esperar ciertas mejoras si se consigue un mejor control de las fuentes de contaminación en el papel de filtro. En efecto, en este trabajo se ha utilizado un tipo de papel de filtro comercializado para la recogida de *DBS* en los programas de cribado neonatal, de forma que las tarjetas de papel de filtro están impresas por un lado para la identificación del paciente y el posicionado de las gotas de sangre a recoger. En estas condiciones diversos estudios han demostrado que se pueden producir señales del "blanco" apreciables y variables, tanto entre distintos lotes, como entre diferentes papeles de filtro de un mismo lote [22,23].

De hecho, la ablación de las áreas impresas reveló la presencia en la tinta empleada de cantidades significativas de algunos de los analitos estudiados (especialmente cobalto, cobre, estaño y níquel), lo que por migración puede provocar niveles de contaminación apreciables en el papel de filtro, incluso si la deposición de la muestra se realiza en áreas libres de tinta.

El procedimiento propuesto en este trabajo asume que todos los papeles de filtro utilizados, tanto para la preparación de los patrones de calibrado como para las muestras, contribuyen en la misma extensión a la señal obtenida para los distintos analitos, de forma que no se realiza ninguna corrección de "blanco". Evidentemente, si esta premisa no se cumple, provocará una mayor dispersión de resultados, porcentualmente más importante para aquellos que se encuentren en menor concentración. No obstante, lo anteriormente expuesto

es una hipótesis y se necesitarían estudios adicionales para evaluar con seguridad la mejora que podría proporcionar en los resultados finales el uso de papeles de filtro más limpios, por ejemplo, sin tinta.

III.5.4. Análisis de muestras reales.

Finalmente se intentó aplicar el método desarrollado a dos muestras reales de orina procedentes de pacientes sanos. La determinación de los distintos analitos en la orina líquida mediante *ICP-MS* como se indica en el Apartado II.5.5, mostró que la mayoría de ellos se encontraba por debajo del límite de detección ya que sólo se pudieron medir bismuto, plomo y cobre (con contenidos entre 5-20 µg L^{-1}). En consecuencia, ambas muestras se doparon con 20 µg L^{-1} de cada analito (40 µg L^{-1} para el níquel por su elevado *LOD*) y se realizó un ensayo de recuperación siguiendo el protocolo optimizado descrito en el apartado anterior: calibración externa con patrones *PS-DUS* emparejados y aplicación del patrón interno "post-muestreo" en el laboratorio.

Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla III.5.3 en la que puede observarse que para todos los analitos se obtuvieron factores de recuperación satisfactorios, dentro del rango del ±15% del valor esperado [20].

Tabla III.5.3. Resultados del ensayo de recuperación realizado sobre dos muestras de orina.

% Recuperación	Be	Bi	Cd	Co	Cu	Ni	Sb	Sn	Tl	Pb	V
muestra 1	103	101	93	89	102	110	102	91	94	104	98
muestra 2	110	95	101	98	96	104	88	106	95	111	93

Los límites de detección para el procedimiento propuesto se calcularon como tres veces la desviación estándar del blanco, que se estimó a partir de diez medidas en tres discos diferentes. Los resultados, expresados como concentración de los distintos elementos en la muestra líquida, se presentan en la Tabla III.5.4.

Tabla III.5.4. Límites de detección para el método analítico optimizado expresados como concentración en la orina líquida.

	Be	Bi	Cd	Co	Cu	Ni	Sb	Sn	Tl	Pb	V
LOD (µg L^{-1})	0.1	0.3	0.5	0.2	13	10	1	0.5	0.1	1	1

Puede observarse que, salvo para el cobre y el níquel, los límites de detección de todos los elementos son iguales o inferiores a 1 µg L^{-1}. Es importante recalcar en este punto que se ha pretendido ofrecer unos valores realistas para la finalidad perseguida, sin intentar alcanzar valores óptimos. En consecuencia, los especímenes de *PS-DUS* se manipularon sin adoptar ninguna precaución especial en cuanto a limpieza, ya que el principal objetivo de este trabajo es su implementación en contextos sin supervisión. La recogida de la muestra por los propios pacientes en el hogar no parece congruente con la adopción posterior en el laboratorio de medidas de precaución muy estrictas contra la contaminación, habituales en laboratorios de análisis de elementos traza, como la manipulación de los discos con guantes estériles o incluso, en campanas de flujo laminar.

Los valores sensiblemente mayores obtenidos para el cobre y el níquel posiblemente sean debidos a la contribución variable de los blancos de los papeles de filtro impresos, como se

discutió en la sección anterior. Parece claro, a partir de estos resultados, que debería establecerse un mejor control de las fuentes de contaminación, especialmente de la tinta utilizada para imprimir los papeles de filtro, ya que parece ser el principal factor limitante para lograr unas mejores prestaciones de este procedimiento de análisis en el rango de bajas concentraciones.

Sin embargo, debería realizarse un estudio más en profundidad, con un mayor número de muestras, para comprobar como el protocolo de preparación de los *PS-DUS* en el hogar puede afectar a las prestaciones del método propuesto, antes de que puedan establecerse conclusiones definitivas sobre este aspecto.

III.5.5. Conclusiones.

Por primera vez se ha desarrollado una metodología general para realizar una determinación directa multielemental, a nivel de µg L^{-1}, en los *DUS*. Para ello se ha utilizado el sistema de recogida de muestra desarrollado en el apartado anterior (difusión limitada por deposición en papel de filtro precortado situado sobre una superficie hidrófoba) y se han realizado las medidas mediante *LA-ICP-MS*. Cada resultado se obtiene como la media de tres medidas realizadas sobre el mismo *DUS*.

Mediante el procedimiento desarrollado se ha realizado la determinación simultánea de once elementos, en concentraciones que oscilaban entre aproximadamente 10 µg L^{-1} y 130 µg L^{-1}. Los resultados obtenidos muestran buena concordancia con los de referencia y la precisión resulta suficiente para los objetivos de estos trabajos (valores de DSR comprendidos entre 5% y 11%, aproximadamente). Los límites de detección varían entre 0.1 µg L^{-1} y 1 µg L^{-1}, excepto para el cobre y el níquel que los tienen algo más elevados. Se puede esperar alguna mejora en estos resultados si se consigue reducir las fuentes de contaminación en el papel de filtro.

La elevada discriminación espacial de la técnica de *LA-ICP-MS*, ha permitido realizar estudios más seguros sobre la distribución de los analitos en los *DUS*. Si la deposición de la orina se realiza en condiciones de difusión libre, los distintos analitos estudiados tienen comportamientos diferentes (lo que ya se había observado con el molibdeno y el titanio mediante *GF-AAS*) y únicamente el cadmio muestra cierta homogeneidad. Si se trabaja en condiciones de difusión limitada las medidas mediante *LA-ICP-MS* demuestran que tampoco se produce una distribución homogénea de los analitos, aunque en este caso los distintos elementos tienen el mismo comportamiento: todos ellos presentan mayor concentración en el borde del *DUS* mientras que se ha demostrado que en el resto del mismo su distribución puede considerarse homogénea. Evidentemente hay que realizar las medidas evitando los bordes del *DUS*, lo que empíricamente ya se había hecho en los apartados anteriores.

Se ha estudiado la forma de añadir el patrón interno (platino en este caso) que resulta muy conveniente en estas determinaciones. Los resultados obtenidos por adición del mismo a la orina antes de la formación de los *DUS* son semejantes a los que se obtienen si dicha adición se realiza sobre los *DUS* ya formados, una vez que éstos se encuentran en el laboratorio clínico. Se ha preferido esta forma de trabajo pues es compatible con realizar la recogida y deposición de la orina en el papel de filtro por el propio paciente en el hogar y, además, permite preservar la orina sin modificar (como *DUS*, una vez seca) para su uso potencial en estudios adicionales.

Como en todos los estudios anteriores, no ha sido posible realizar el calibrado con patrones acuosos, siendo preciso utilizar patrones emparejados. Adicionalmente, para los elementos cadmio, cobre y plomo se realizó también la determinación por dilución isotópica, con resultados semejantes a los obtenidos mediante patrones emparejados.

III.5.6. Bibliografía

[1] D.C. Paschal, B.G. Ting, J.C. Morrow, J.L. Pirkle, R.J. Jackson, E.J. Sampson, D.T. Miller, K.L. Caldwell. Trace metals in urine of United States residents: reference range concentrations. *Environ. Res.*, 1998, 76, 53–59.

[2] M. Zeiner, M. Ovari, G. Zaray, I. Steffan. Selected urinary metal reference concentrations of the Viennese population - urinary metal reference values (Vienna). J*. Trace Elem. Med. Bio.*, 2006, 20, 240–244.

[3] J. Pisonero, B. Fernandez, D. Guenther. Critical revision of GD-MS, LA-ICP-MS and SIMS as inorganic mass spectrometric techniques for direct solid analysis. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2009, 24, 1145–1160.

[4] C.P. Stove, A.-S.M.E. Ingels, P.M.M. De Kesel, W.E. Lambert. Dried blood spots in toxicology: from the cradle to the grave? *Crit. Rev. Toxicol.*, 2012, 42, 230–243.

[5] A. Sarmiento-González, J.M. Marchante-Gayón, J.M. Tejerina-Lobo, J. Paz-Jiménez, A. Sanz-Medel. High-resolution ICP-MS determination of Ti, V, Cr, Co, Ni, and Mo in human blood and urine of patients implanted with a hip or knee prosthesis. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2008, 391, 2583–2589.

[6] C. Gonçalves Magalhaes, B. Rolla Nunes, M.B.L. Oss Giacomelli, J. Borba da Silva. Direct determination of bismuth in urine samples by electrothermal atomic absorption spectrometry: study of chemical modifiers. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, 18, 787–789.

[7] N. Miekeley, S.R. Mortari, A.O. Schubach. Monitoring of total antimony and its species by ICP-MS and on-line ion chromatography in biological samples from patients treated for leishmaniasis. *Fresenius J. Anal. Chem.*, 2002, 372 495–502.

[8] A. Ala, A.P. Walker, K. Ashkan, J.S. Dooley, M.L. Schilsky. Wilson's disease. *Lancet*, 2007, 369, 397–408.

[9] B. Fernandez, F. Claverie, C. Pécheyran, J. Alexis, O.F.X. Donard. Direct determination of trace elements in powdered samples by in-cell isotope dilution femtosecond laser ablation ICPMS. *Anal. Chem.*, 2008, 80, 6981–6994.

[10] M. Resano, E. García-Ruiz, F. Vanhaecke. Laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry in archaeometric research. *Mass Spectrom. Rev.*, 2010, 29, 55–78.

[11] U. Kumtabtim, A. Siripinyanond, C. Auray-Blais, A. Ntwari, J.S. Becker. Analysis of trace metals in single droplet of urine by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Int. J. Mass Spectrom.*, 2011, 307, 174–181.

[12] D. Hare, C. Austin, P. Doble. Quantification strategies for elemental imaging of biological samples using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *Analyst*, 2012, 137, 1527–1537.

[13] J. Triglav, J.T. van Elteren, V.S. Šelih. Basic modeling approach to optimize elemental imaging by laser ablation ICPMS. *Anal. Chem.*, 2010, 82, 8153–8160.

[14] M. Aramendía, M. Resano, F. Vanhaecke. Isotope ratio determination by laser ablation-single collector-inductively coupled plasma-mass spectrometry. General capabilities and possibilities for improvement. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2010, 25, 390–404.

[15] M. Resano, E. García-Ruiz, K.S. McIntosh, F. Vanhaecke. Laser ablation-inductively coupled plasma-dynamic reaction cell-mass spectrometry for the determination of platinum group metals and gold in NiS buttons obtained by fire assay of platiniferous ores. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2008, 23, 1599–1609.

[16] M. Resano, K.S. McIntosh, F. Vanhaecke. Laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry using a double-focusing sector field mass spectrometer of Mattauch–Herzog geometry and an array detector for the determination of platinum group metals and gold in NiS buttons obtained by fire assay of platiniferous ores. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2012, 27, 165–173.

[17] D.A. Frick, D. Günther. Fundamental studies on the ablation behaviour of carbon in LA-ICP-MS with respect to the suitability as internal standard. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2012, 27, 1294–1303.

[18] P. Abu-Rabie. Direct analysis of DBS: emerging and desirable technologies. *Bioanalysis*, 2011, 3, 1675–1678.

[19] P. Abu-Rabie, P. Denniff, N. Spooner, J. Brynjolffssen, P. Galluzzo, G. Sanders. Method of applying internal standard to dried matrix spot samples for use in quantitative bioanalysis. *Anal. Chem.*, 2011, 83, 8779–8786.

[20] K.E. Levine, C. Tudan, P.M. Grohse, F.X. Weber, M.A. Levine, Y.-S.J. Kim. Aspects of bioanalytical method validation for the quantitative determination of trace elements. *Bioanalysis*, 2011, 3, 1699–1712.

[21] P. Rodríguez-González, J.M. Marchante-Gayón, J.I. García Alonso, A. Sanz-Medel. Isotope dilution analysis for elemental speciation: a tutorial review. *Spectrochim. Acta Part B*, 2005, 60, 151–207.

[22] S.N. Chaudhuri, S.J.M. Butala, R.W. Ball, C.T. Braniff. Pilot study for utilization of dried blood spots for screening of lead, mercury and cadmium in newborns. *J. Expos. Sci. Environ. Epidemiol.*, 2009, 19, 298–316.

[23] E.K. Langer, K.J. Johnson, M.M. Shafer, P. Gorski, J. Overdier, J. Musselman, J.A. Ross. Characterization of the elemental composition of newborn blood spots using sector-field inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J. Expos. Sci. Environ. Epidemiol.*, 2011, 21, 355–364.

III.6. Determinación directa de la relación isotópica de cobre en orina en los dus mediante *LA-ICP-MS* como diagnóstico de la enfermedad de Wilson.

El cobre es un elemento esencial para el correcto funcionamiento de varias metaloenzimas con actividad oxidasa pues participa en las siguientes funciones: producción de energía (citocromo C oxidasa), metabolismo del hierro (ceruloplasmina), antioxidante (superóxido dismutasa), formación del tejido conectivo (lisil oxidasa), metabolismo de neurotransmisores (dopamina β-hidroxilasa y monoamina oxidasa), catabolismo de poliaminas (espermina oxidasa y diamina oxidasa), formación de melanina (tirosinasa) y metabolismo intermediario (uricasa y benzilamina oxidasa, entre otras). A pesar de este papel esencial, la regulación de la cantidad de cobre en el cuerpo es crítica porque, como consecuencia de su potencial oxidante, cuando se encuentra en forma libre, el cobre induce la producción de radicales libres reactivos que finalmente generarán daños celulares [1].

El cobre se capta principalmente en el duodeno e intestino delgado proximal (donde se absorbe aproximadamente el 50% del cobre de la dieta) y luego es transferido a la sangre vía circulación portal en un proceso facilitado por la unión del cobre con aminoácidos y albúmina; la mayoría de este cobre llega al hígado, donde se incorpora a la proteína sérica ceruloplasmina, una ferroxidasa que participa en el metabolismo del hierro y que representa aproximadamente el 75-90% del contenido total del cobre en el plasma.

El resto del cobre plasmático, el que no está enlazado a la ceruloplasmina, se une débilmente a α-2 macroglobulina, albúmina y aminoácidos (principalmente histidina) y constituye la fracción del cobre que puede ser intercambiada entre tejidos [2]. En mamíferos, la captación del cobre intestinal no parece estar regulada, y la homeostasis del cobre se alcanza principalmente mediante el ajuste de la cantidad del elemento que se excreta desde el hígado hacia la bilis [3,4].

Las enfermedades más destacadas relacionadas con el metabolismo del cobre, determinadas genéticamente, son la enfermedad de Wilson, la enfermedad de Menkes y el síndrome del Asta Occipital (*Occipital Horn's Syndrome*) que se puede considerar como una variante más benigna de la anterior [2]. Mientras que la enfermedad de Menkes es normalmente fatal en la primera infancia, la enfermedad de Wilson puede ser tratada y generalmente presenta un desarrollo favorable si se diagnostica antes de la aparición de síntomas, cuando todavía no se han producido daños irreversibles.

La alteración de la homeostasis normal del cobre que conduce a un exceso tóxico del mismo es evidente en la enfermedad de Wilson, que afecta a uno de cada aproximadamente 30000 individuos [5]. Esta enfermedad está causada por mutaciones en el gen *ATP7B*, que codifica la proteína ATP7B, la cual facilita tanto la incorporación del cobre a la ceruloplasmina para su posterior liberación a la circulación sanguínea, como la eliminación del exceso de cobre mediante su transporte hacia los canalículos biliares [6].

En las personas con la enfermedad de Wilson ambas funciones de la ATP7B se encuentran alteradas. La primera consecuencia es que la ceruloplasmina se secreta a la sangre en una forma en la que carece de átomos de cobre (denominada apoceruloplasmina) y que se degrada rápidamente en el torrente sanguíneo [7]; además, también se ve afectada la excreción del cobre por vía biliar, de forma que este elemento comienza a acumularse en el hígado. Esta sobrecarga hepática de cobre conduce a una disfunción de los hepatocitos y finalmente a su muerte con la consiguiente liberación del cobre al torrente sanguíneo, lo que

se traduce en su captación y acumulación gradual en otros tejidos, principalmente del sistema nervioso central.

Como consecuencia de todo lo anterior, los pacientes de la enfermedad de Wilson comienzan con síntomas hepáticos y/o neurológicos, pudiendo evolucionar a un estado clínico grave, que llegue incluso a la muerte, si no se les proporciona ningún tratamiento [5]. Éstos son relativamente simples y económicamente asequibles ya que están basados en la administración de por vida de agentes quelantes, que eliminen el elemento acumulado en los órganos diana, y/o sales de cationes divalentes que compitan con el cobre por su absorción intestinal. Con este fin se utilizan D-penicilamina, tetramolibdato, acetato o sulfato de cinc y trientina (trietilentetramina dihidrocloruro) que consiguen detener la progresión de la enfermedad en pacientes sintomáticos o impiden el desarrollo de síntomas si el paciente todavía está asintomático [8].

La enfermedad de Wilson puede considerarse una candidata perfecta para ser incluida en los programas de cribado neonatal de enfermedades endocrino-metabólicas, puesto que se trata de una enfermedad genética, presente desde el nacimiento, y existen terapias efectivas para la misma [9]. Desafortunadamente, el diagnóstico de la enfermedad de Wilson es un reto para el clínico, tanto en pacientes asintomáticos como en los sintomáticos, ya que estos síntomas son totalmente inespecíficos y comunes a otras muchas enfermedades, por lo que la investigación de métodos alternativos de diagnóstico es un campo de intensa investigación [8,10], con especial interés dentro de la pediatría [9,11].

En la actualidad, no existe un marcador de la enfermedad de Wilson que sea completamente fiable, y el diagnóstico se consigue mediante la aplicación de un sistema de puntuación que combina síntomas clínicos con datos bioquímicos [12]. El dato bioquímico más significativo de esta enfermedad es un alto nivel de cobre en el tejido hepático (considerado como el patrón de oro), para cuya determinación se requiere realizar una biopsia hepática, procedimiento muy invasivo y que no siempre puede realizarse, dependiendo de las circunstancias clínicas del paciente. Adicionalmente, existen otros marcadores menos invasivos, como bajos niveles séricos de cobre y ceruloplasmina, así como valores ligeramente incrementados de cobre en orina [13], para los que se podrían desarrollar, en principio, métodos de análisis basados en la deposición de las muestras (sangre u orina) en papeles de filtro clínicos y así beneficiarse de la implementación en los programas de cribado neonatal que usan dicho tipo de muestras.

El problema con estos marcadores bioquímicos mínimamente invasivos es que se observa una superposición en los rangos de referencia entre pacientes afectos de la enfermedad de Wilson en el momento del diagnóstico y sujetos sanos, especialmente en neonatos y lactantes, ya que éstos suelen presentar valores de cobre y ceruloplasmina en suero bastante más bajos que los adultos sanos, debido a una inmadurez hepática fisiológica [7,14,15]. Por este motivo, el uso de las concentraciones de cobre y ceruloplasmina para el cribado neonatal de la enfermedad de Wilson no ha tenido éxito [16].

Sin embargo, no se ha estudiado la posibilidad de abordar este problema mediante el análisis isotópico. Teniendo en cuenta que el fraccionamiento isotópico suele ir asociado a las reacciones (bio)químicas [17], puede esperarse que la proteína ATP7B interaccione con los dos isótopos naturales del cobre (^{63}Cu y ^{65}Cu) con rendimientos ligeramente diferentes, aunque esto puede ser difícil de medir en el caso de proteínas funcionales operando con una eficiencia próxima al 100%. Sin embargo, la proteína ATP7B defectuosa encontrada en los pacientes de la enfermedad de Wilson muestra una eficiencia mucho menor en la incorporación del cobre a la ceruloplasmina y, por lo tanto, la presencia preferencial en los fluidos biológicos de uno de los isótopos naturales puede ser más clara para los enfermos de la enfermedad de Wilson que

para otros individuos que muestren bajos niveles séricos de cobre por otras razones distintas, como son fundamentalmente los neonatos y lactantes y los pacientes que se han sometido a cirugía bariátrica [18]. Si esto es así, el desarrollo de una metodología apropiada para la determinación de la relación isotópica del cobre puede abrir nuevas posibilidades para la detección temprana de la enfermedad de Wilson.

En este contexto, el desarrollo de la técnica de *ICP-MS* con detectores multicolectores aporta una nueva dimensión al campo del análisis isotópico, ya que presenta menores requisitos en términos de preparación de la muestra cuando se compara con las técnicas tradicionales (*TIMS*, espectrometría de masas por ionización térmica), por lo que ofrece mayor productividad y permite el estudio de elementos difíciles de ionizar mediante ionización térmica. La precisión se mantiene dentro de rangos comparables (DSR de hasta un 0.001%, en el mejor de los casos) y es significativamente mejor (en un factor de 50-100) a la que se puede obtener por medio de *ICP-MS* basado en cuadrupolo o campo magnético [17].

Además, la mayor eficiencia del *ICP* para producir iones cargados positivamente para prácticamente todos los elementos de la tabla periódica ha propiciado que se estudien nuevos sistemas isotópicos, abriendo posibilidades de investigación en muchos campos distintos de los tradicionales en los que el análisis isotópico ya está bien establecido, por ejemplo, el geoquímico y el forense. Esto incluye el desarrollo de aplicaciones médicas y biológicas [18-21], aunque la presencia de este tipo de instrumentación en los laboratorios clínicos todavía es limitada, probablemente debido a su elevado coste (500,000-1,000,000 euros) y a la necesidad de personal técnico experto.

Adicionalmente, el acoplamiento de los instrumentos de *ICP-MS* con detectores multicolectores con nuevos sistemas de ablación láser, como por ejemplo, los láseres de femtosegundo de alta frecuencia debe permitir el muestreo de mayores cantidades de material, lo que es aconsejable tanto desde el punto de vista de la sensibilidad como de la representatividad de los resultados.

En cualquier caso, como se ha apuntado anteriormente, con el propósito de implementar un cribado neonatal de la enfermedad de Wilson, la metodología a desarrollar debería beneficiarse de los programas que ya están funcionando, lo que ayudaría a lograr una amplia difusión. Para ello, los analitos deberían ensayarse en los especímenes utilizados en dichos programas, esto es, sangre y/u orina seca en papel de filtro clínico [9,11]. Para este primer estudio, se ha escogido la orina en lugar de la sangre, por tratarse de una matriz menos compleja, lo que puede facilitar la obtención de mejores resultados mediante *LA-ICP-MS*.

El propósito de este trabajo es investigar un método para el análisis isotópico directo de cobre en muestras de orina absorbida y seca sobre papel de filtro clínico (*DUS*), con el fin de establecer potenciales diferencias para los pacientes de la enfermedad de Wilson, lo que no se ha descrito hasta la fecha. Para lograr este objetivo, además de aprovechar el sistema de preparación de la muestra que se ha optimizado en los dos apartados anteriores, se realizará un acoplamiento del *ICP-MS* con detectores multicolectores con un láser de femtosegundo de alta frecuencia. Este acoplamiento puede combinar la elevada precisión típica de *ICP-MS* con detectores multicolectores, posiblemente requerida para apreciar diferencias significativas en este caso, con el potencial de muestreo flexible proporcionado por un nuevo dispositivo de láser de femtosegundo, necesario para obtener suficiente sensibilidad.

III.6.1. Consideraciones sobre la sensibilidad y la deposición de la muestra.

Uno de los principales problemas del tema abordado en este trabajo es el contenido relativamente bajo de cobre en la orina de los pacientes sujetos a la investigación. Los niveles de cobre presentes en las muestras se determinaron previamente (Apartado II.5.8) mediante el procedimiento habitual, utilizando *GF-AAS* y las muestras de orina líquidas [22]. Como era de esperar, el nivel de cobre para los pacientes de la enfermedad de Wilson que estaban siguiendo tratamiento con penicilamina (un quelante) fueron significativamente mayores que el de las personas sanas, variando desde 128 µg L^{-1} hasta 699 µg L^{-1}, debido a que la toma de este quelante ayuda a liberar al cobre de los órganos en los que queda retenido cuando se desarrolla la enfermedad como por ejemplo, el hígado [10,23,24]. Por el contrario, los enfermos de la enfermedad de Wilson que todavía no tenían instaurado ningún tratamiento presentaban valores de cobre en orina entre 34 µg L^{-1} y 73 µg L^{-1}, y concentraciones algo menores cabe esperar en personas sanas.

Aunque el *ICP-MS* con detectores multicolectores utilizado en este trabajo esta equipado con dos contadores de iones, es necesario recalcar que la configuración de su detector no permite medir simultáneamente las relaciones masa/carga (m/z) 63 y 65 usando estos contadores y se han de utilizar en su lugar copas de Faraday, con la consiguiente pérdida de sensibilidad. Además, a estos bajos niveles, la contribución de especies interferentes puede ser significativa y, en particular, debería controlarse la contribución de $^{40}Ar^{23}Na^{+}$ sobre la señal de cobre para m/z = 63, puesto que el NaCl está presente en orina a una concentración de unos 1000 mg L^{-1} [19].

Para tratar de minimizar estos problemas, uno de los aspectos clave que ya se han comentado ampliamente en los dos capítulos anteriores, es la forma de depositar la orina en los filtros clínicos para la formación de los *DUS*, de forma que el uso de pequeñas porciones de papel de filtro limita el área en la cual la orina se expande, aumentando, por tanto, la cantidad de orina retenida por unidad de superficie. En este trabajo se utilizaron los mismos tipos de papel de filtro precortados que en el apartado anterior, esto es, discos de 16 mm de papel de filtro Whatman 903 en el que se depositan 300 µL de orina. Hay que recordar que esta cantidad se corresponde con el máximo volumen de orina que la tensión superficial de la muestra es capaz de retener en los trozos de papel de filtro de este tamaño, proporcionando la concentración de muestra más alta posible en los especímenes *PS-DUS* con un sólo ciclo de deposición y secado (≈150 µL de orina cm^{-2}), que es entre 10-12 veces más alta que la concentración que se obtiene cuando la orina se deposita en tarjetas de papel de filtro de gran tamaño.

Como también se comentó, esta metodología de muestreo, además de provocar un aumento de sensibilidad necesario para poder realizar el análisis, es compatible con la implementación en programas donde se potencie la recogida de muestra en el hogar por el propio paciente y, sobre todo, minimiza en gran medida la aparición de efectos cromatográficos. En el Apartado III.5.1 se demostró que con esta forma de preparación de los *PS-DUS*, la distribución de metales, incluyendo el cobre, es más homogénea que cuando se permite la libre difusión de la orina en la celulosa, aunque todavía existe una concentración significativamente mayor (aproximadamente en un factor de 2) en el borde del *PS-DUS* respecto del resto del mismo. De hecho, este factor puede ser usado favorablemente en el presente trabajo, siempre que no se produzca un fraccionamiento isotópico espacial sobre la superficie del papel.

Finalmente, es muy importante señalar que en este trabajo, para la preparación de los discos de papel de filtro de 16 mm sobre los que depositar la orina, se partió de pliegos de

papel de filtro Whatman 903 blancos, sin ningún tipo de tinta, a diferencia de los trabajos anteriores, en los que se partió de las tarjetas del cribado neonatal de Aragón y, por tanto, impresas para señalar la zona donde anotar el nombre del bebé y donde depositar las gotas de sangre (ver, por ejemplo, Figura II.8). Las experiencias anteriores indicaron que esta tinta puede contener impurezas de cobre, por lo que siempre que sea posible, es preferible la utilización de un papel de filtro completamente blanco.

III.6.2. Monitorización de las muestras por *LA-ICP-MS* con detectores multicolectores y potenciales interferencias.

Teniendo en cuenta la concentración de cobre en las muestras determinada previamente, la cantidad absoluta de cobre contenida en los *PS-DUS* variaba desde 38 ng hasta 210 ng (esto es, desde 0.19 ng mm^{-2} hasta 1.05 ng mm^{-2}) para los pacientes de la enfermedad de Wilson tratados con penicilamina, y desde 10 ng hasta 22 ng (desde 0.05 ng mm^{-2} hasta 0.11 ng mm^{-2}) para los enfermos no tratados. Debido a la baja intensidad de señal de los instrumentos *ICP-MS* con detectores multicolectores equipados con copas de Faraday, estas cantidades tan bajas limitan la precisión que se puede obtener en la medida de la relación isotópica $^{65}Cu/^{63}Cu$. En consecuencia, debe usarse una estrategia de ablación apropiada para lograr intensidades de señal suficientemente altas.

El uso de la unidad láser de femtosegundo puede ser de gran importancia para esta aplicación. Este tipo de láser proporciona ventajas bien conocidas para el análisis isotópico, puesto que se ha demostrado que una duración del pulso más corta (en el rango de femtosegundos) reduce drásticamente los efectos térmicos, minimiza el fraccionamiento isotópico (entendido como la diferencia entre la composición de la muestra y la de las partículas formadas tras el proceso de ablación) así como la dependencia de la matriz, en comparación con los láseres de pulsos en el rango de nanosegundos [25,26]. Además, el uso del láser de femtosegundo incrementa la intensidad y estabilidad de la señal, limitando la producción de anómalos (*spikes*) debidos a la producción de partículas relativamente grandes, lo que conduce finalmente a mejoras en la precisión y en el sesgo, en comparación con los láseres de nanosegundo [27,28].

Existen en el mercado diferentes tipos de unidades de láser de femtosegundo [29-31], pero para esta aplicación particular, quizás el más adecuado sea el que ha sido descrito por Pécheyran *et al*. en una serie de trabajos [32-34]. En lugar de emplear altas energías (>1 mJ/pulso) y bajas velocidades de repetición (1-20 Hz), como la mayoría de aparatos, este dispositivo está basado en el uso de una unidad láser de relativamente baja energía (hasta unos 200 µJ/pulso a 257 nm). Aunque para mantener una fluencia suficientemente amplia, el diámetro del láser debe ser pequeño (10 µm o menos), este inconveniente puede ser compensado combinando un sistema de escaneo rápido del haz láser con una frecuencia elevada (hasta 100,000 Hz).

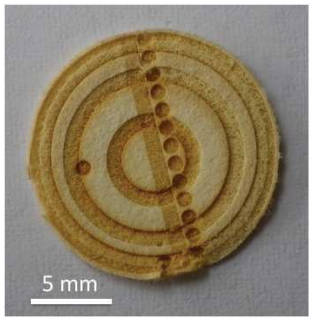
En otras palabras, los pequeños cráteres correspondientes al tamaño del haz del láser (8 µm en nuestro caso) se repiten de tal modo que se solapan parcialmente, mientras que el láser se desplaza rápidamente sobre la superficie de la muestra y se disparan muchos pulsos. Esta estrategia permite ablacionar áreas de muestra grandes en un tiempo reducido, lo que proporciona señales transitorias breves, incrementando notablemente la relación señal/ruido de fondo. Se ha demostrado que esta aproximación es satisfactoria para incrementar la sensibilidad en aplicaciones relativamente similares a la estudiada en este trabajo (por ejemplo, para el análisis de metales en geles [33]). Además, esta unidad permite una alta

flexibilidad con respecto al muestreo del *PS-DUS*, ya que en la práctica se puede usar cualquier forma geométrica que se desee en el proceso de ablación (líneas, cráteres, coronas, etc.).

El láser usado en este trabajo representa una mejora del dispositivo descrito en trabajos previos [32-36], ya que opera en la región ultravioleta y no en la región infrarroja. Esto, en principio, debería ser beneficioso para reducir aún más el fraccionamiento [25], pero su sistema básico de funcionamiento sigue siendo el mismo.

Así, teniendo en cuenta todo lo anterior, se evaluó la ablación de las muestras de *PS-DUS* siguiendo diferentes geometrías, como se muestra en la Figura III.6.1.

Figura III.6.1. Ablación de los *PS-DUS* utilizando diferentes estrategias de muestreo (cráteres, coronas, etc.).



A partir de estas primeras medidas, se pudieron extraer las siguientes conclusiones:

a) La ablación de áreas cercanas al borde ofrece la mejor sensibilidad (mejora en un factor de dos, comparada con el área central), como era de esperar tras los experimentos realizados en el estudio de la determinación multielemental en *PS-DUS* mediante *LA-ICP-MS* (Apartado III.5.1).

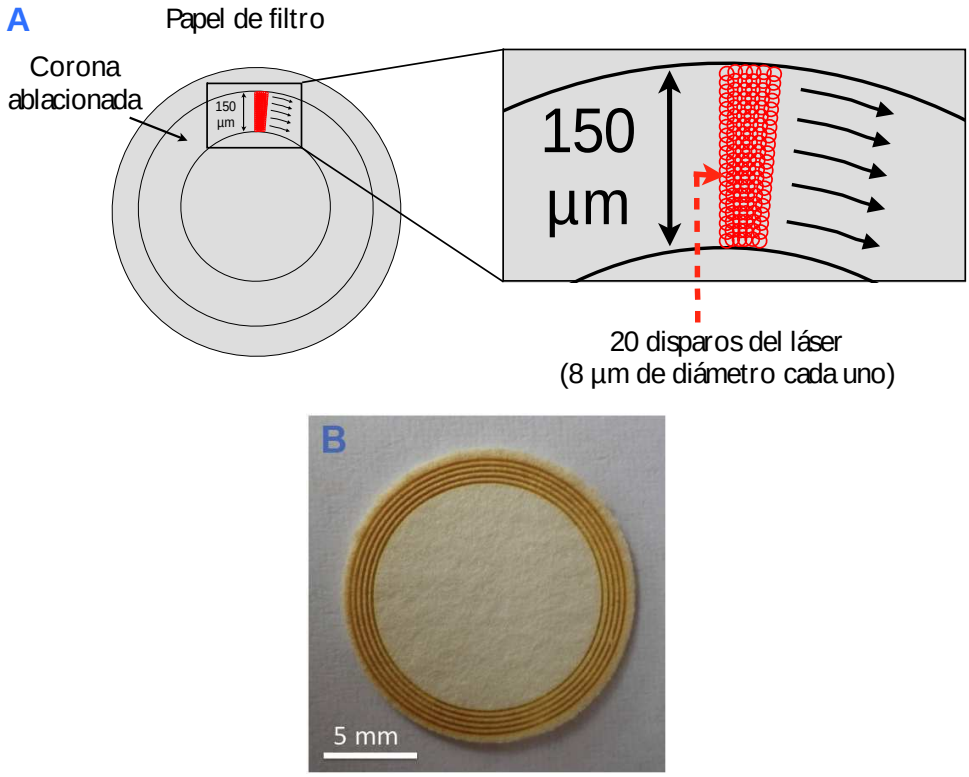
b) No es recomendable efectuar una ablación muy prolongada, ya que la señal disminuye significativamente si la ablación alcanza el fondo del papel de filtro.

c) Más importante, las relaciones isotópicas obtenidas se desvían significativamente de las esperadas (la relación natural para $^{65}Cu/^{63}Cu$ es aproximadamente 0.44613 [37]) y aparecían consistentemente sesgadas hacia valores menores (en torno a 0.43), contrariamente a lo que cabría esperar si el factor dominante que explicara estas inexactitudes fuese un sesgo de masa instrumental. Efectivamente, en un *ICP-MS* la señal obtenida para masas altas suele ser superior, ya que dichas masas ejercen repulsión electrostática sobre las pequeñas en su camino hacia el analizador de masas. Por lo tanto, deben existir otros motivos para justificar el comportamiento mostrado. Se observaron indicios de efectos de matriz en el plasma (supresión de la señal del níquel, que se aspiraba de una disolución, cuando el material ablacionado llegaba al plasma), lo que podría contribuir en alguna medida al efecto final observado; sin embargo, la influencia del $^{40}Ar^{23}Na^{+}$ sobre el $^{63}Cu^{+}$ es probablemente muy significativa para esta muestra, lo que explica los resultados obtenidos (relación 65/63 menor que la esperada).

Los dos primeros aspectos pueden solventarse fácilmente, debido al potencial de la unidad láser para un análisis con gran resolución espacial. Al final, se decidió ablacionar coronas relativamente pequeñas, de 150 µm de ancho, (considerando la diferencia entre el radio más

interno y el más externo), que se construyen mediante una rápida rotación de un haz láser de un diámetro de 8 µm (utilizando 20 líneas concéntricas por corona, como aparece ilustrado en la Figura III.6.2A), de acuerdo a las condiciones experimentales mostradas en la Tabla II.7. Esta estrategia de muestreo permite la ablación de aproximadamente 7 mm^2 en unos 100 s.

Figura III.6.2. Método de ablación para el muestreo en corona de un *PS-DUS*.



A) Estrategia para la ablación de una corona con 150 µm de ancho mediante la rápida translación de un láser con un diámetro de 8 µm; para la construcción de la corona, se ablacionaron 20 líneas circulares concéntricas.B) Ejemplo de una muestra de *PS-DUS* ablacionada en cinco localizaciones diferentes (cinco réplicas) utilizando la estrategia de muestreo en corona.

La profundidad de las coronas varía con su radio (cuanto más pequeño es el radio, más profundo debe ser el cráter para ablacionar la misma cantidad de muestra), pero se mantiene siempre en el rango de 100-150 µm, mientras que el grosor del papel es de aproximadamente 400-500 µm. Así, nunca se ablacionaba el papel de filtro en todo su espesor, logrando la máxima sensibilidad a la vez que se evita cualquier problema de contaminación, por ablación de la cinta adhesiva de doble cara con la que se fija la posición del *PS-DUS* en la cámara de muestreo. La Figura III.6.2B muestra un espécimen *PS-DUS* tras la ablación de 5 de estas coronas.

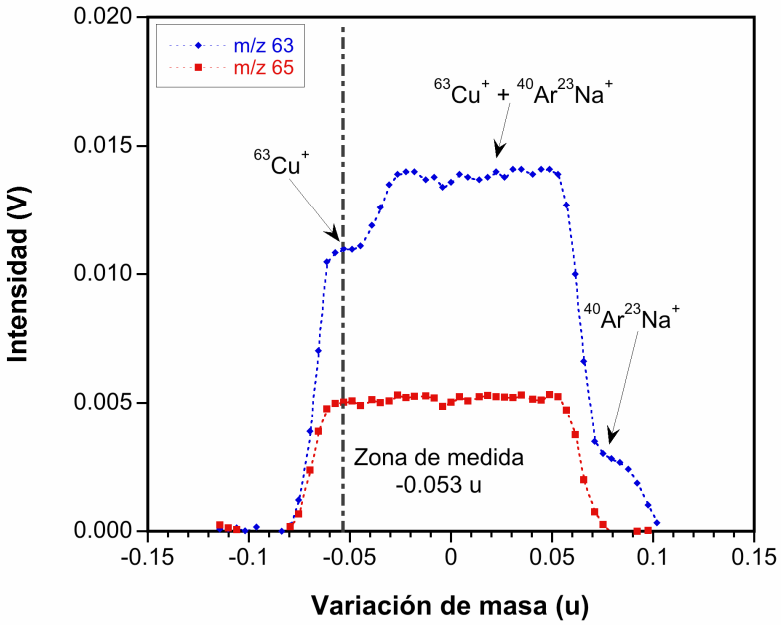
Para compensar la discriminación no-espectral de masa, tanto instrumental como dependiente de la matriz, se evaluó el uso de níquel como patrón interno [38,39]. Para esto, se requiere la aspiración simultánea de una disolución de níquel que alcance el plasma junto con el aerosol del láser y esta estrategia proporciona un plasma húmedo que, en principio, es más robusto que uno seco [40-42]. Se prefirió el níquel en lugar del cinc, otro elemento a menudo seleccionado como patrón interno para el análisis isotópico del cobre mediante *ICP-MS* con detectores multicolectores [43-45], debido a que el potencial de ionización del níquel es más similar al del cobre y, además, el níquel es menos propenso a sufrir problemas de contaminación que el cinc [19,46].

Por otra parte, el instrumento *ICP-MS* con detectores multicolectores utilizado en este trabajo ofrece la posibilidad de incrementar la resolución espacial mediante el uso de una

Por otra parte, el instrumento *ICP-MS* con detectores multicolectores utilizado en este trabajo ofrece la posibilidad de incrementar la resolución espacial mediante el uso de una rendija de entrada de alta resolución (más estrecha) a la vez que se utiliza una rendija convencional en el detector. De esta forma, se mantiene una señal con forma trapezoidal y, por lo tanto, con una zona de máximo estable y relativamente amplia, que permite obtener mejor precisión que con un pico triangular [47]. Los picos de la interferencia y del analito no están totalmente resueltos, pero existe una zona espectral en la cual la señal es debida únicamente al analito y sigue siendo esencialmente constante.

Este modo de operación de *pseudo* alta resolución es bien conocido [17,39,47], y se ha utilizado previamente con éxito para el análisis isotópico del cobre [48]. En estos estudios, la posición óptima para realizar la medición se evaluó antes de cada medida individual, y la señal $^{63}Cu^{+}$ se determinó alejada aproximadamente 0.053 m/z (desplazada hacia una masa menor) respecto de la posición central, que se hubiese seleccionado si no hubiese existido este solapamiento. Esta forma de trabajo se aprecia con claridad en la Figura III.6.3.

Figura III.6.3. Optimización de la zona espectral de medida usando *pseudo* alta resolución para evitar la interferencia de $^{40}Ar^{23}Na^{+}$ sobre el $^{63}Cu^{+}$.



Para evaluar estas estrategias de corrección se llevaron a cabo varias experiencias consistentes en medir la relación isotópica del cobre por aspiración de una disolución de 40 µg de Cu L^{-1} mientras se ablacionaba un papel de filtro blanco o un papel de filtro en el que se había depositado una disolución de 2500 mg L^{-1} de NaCl. Posteriormente también se midió dicha relación isotópica por ablación de un papel de filtro seco sobre el que se habían depositado sucesivamente disolución de cobre (de 1 mg L^{-1}, una concentración que permitía obtener una señal similar a la de la disolución) y, una vez seco, disolución de 2500 mg L^{-1} de NaCl. Los resultados más significativos de estas experiencias se presentan en la Tabla III.6.1.

Tabla III.6.1. Relaciones $^{65}Cu/^{63}Cu$ obtenidas en varias condiciones de trabajo.

Modo de introducción del cobre	Resolución de masa	Medidas sin corrección	Níquel como patrón interno		Relación isotópica "natural" del cobre
		Sin NaCl	Sin NaCl	Con NaCl	
Disolución	Baja	0.46950 ± 0.00005	0.44630 ± 0.00010	0.42775 ± 0.00180	0.44613
Disolución	*Pseudo* alta	0.46935 ± 0.00015	0.44655 ± 0.00014	0.44448 ± 0.00048	0.44613
Deposición sobre un papel de filtro	*Pseudo* alta	0.46880 ± 0.00024	0.44606 ± 0.00021	0.44499 ± 0.00044	0.44613

La incertidumbre analítica se expresa como dos veces la desviación estándar de cinco réplicas.

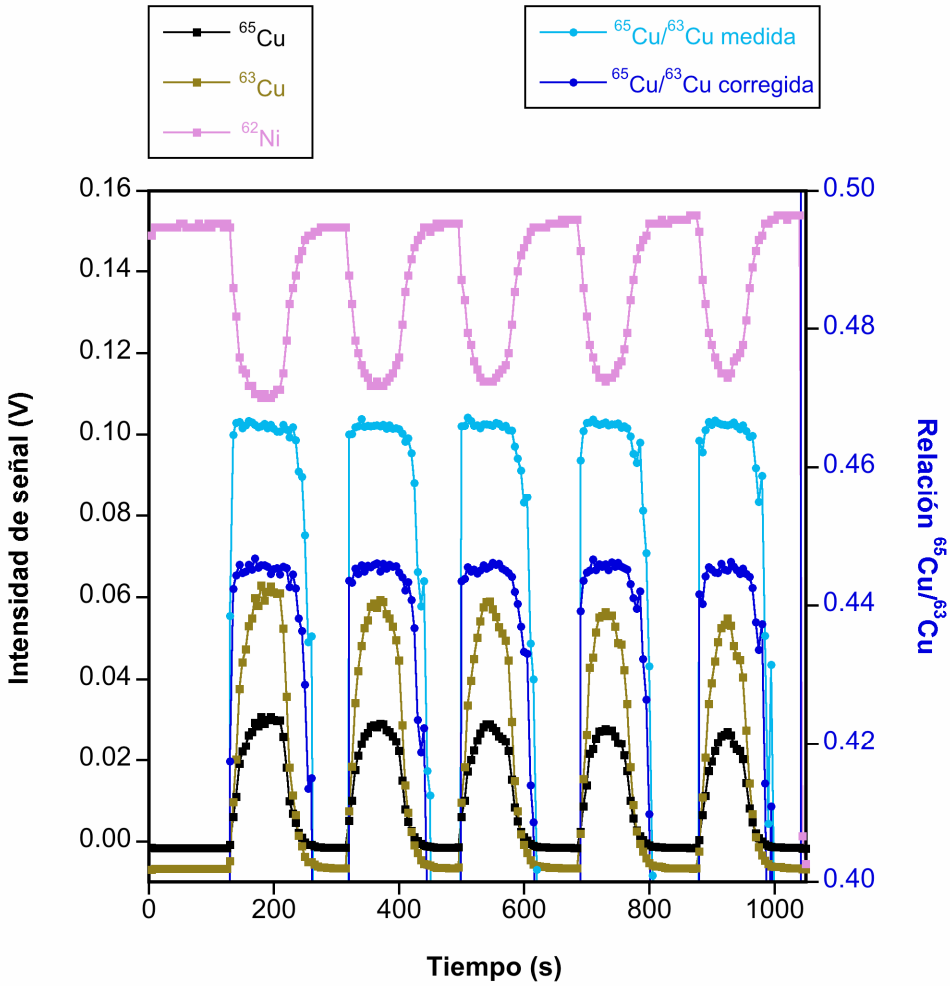
Puede apreciarse que cuando se trabaja con baja resolución, la ablación de papel de filtro sin NaCl no parece provocar ningún efecto negativo significativo. No existen indicios de efectos de matriz (la señal para el níquel adicionado fue muy constante, independientemente de si se ablacionaba o no simultáneamente papel de filtro blanco), el valor para la relación isotópica del cobre, tras la corrección por sesgo instrumental de masa, es próximo a la relación natural esperada y la precisión es bastante buena (aproximadamente una DSR de 100 ppm para una señal de intensidad de aproximadamente de 1 V para el ^{63}Cu). Sin embargo, si el papel de filtro contiene NaCl la situación es bastante diferente: se pueden observar indicaciones claras de efectos de matriz en la intensidad de la señal del níquel, la precisión se deteriora en un factor de 20 y aparece un sesgo de más del 4%.

Este problema puede ser minimizado trabajando en *pseudo* alta resolución, como se ha descrito anteriormente. Este modo de trabajo provoca una disminución significativa en la sensibilidad (aproximadamente, de 10 veces), lo que lógicamente implica una menor precisión en ausencia de especies interferentes pero, cuando el NaCl está presente, el sesgo observado decrece significativamente y la precisión es 4-5 veces mejor que cuando se utiliza la baja resolución. Resultados similares se obtienen cuando el cobre no se introduce desde una disolución, sino que es ablacionado desde un papel de filtro, lo que abre el camino para el análisis de las muestras reales preparadas como *PS-DUS* ablacionando coronas del mismo y midiendo la señal de los isótopos del cobre con *pseudo* alta resolución.

III.6.3. Cálculo de la relación isotópica en el caso de señales transitorias de corta duración.

Los resultados obtenidos hasta ahora pueden considerarse satisfactorios, pero todavía existe un margen de mejora dependiendo del modo en que se traten las señales transitorias. La Figura III.6.4 muestra una señal típica obtenida cuando se ablaciona un *PS-DUS* de 16 mm en diámetro siguiendo la estrategia de muestreo en corona en cinco localizaciones diferentes (comenzando desde el borde del *PS-DUS*). Asimismo se representan las relaciones $^{65}Cu/^{63}Cu$ para cada medida, sin corregir, y corregidas utilizando el níquel como patrón interno.

Figura III.6.4. Señales transitorias obtenidas al ablacionar un *PS-DUS* en cinco localizaciones utilizando la estrategia de muestreo en corona.



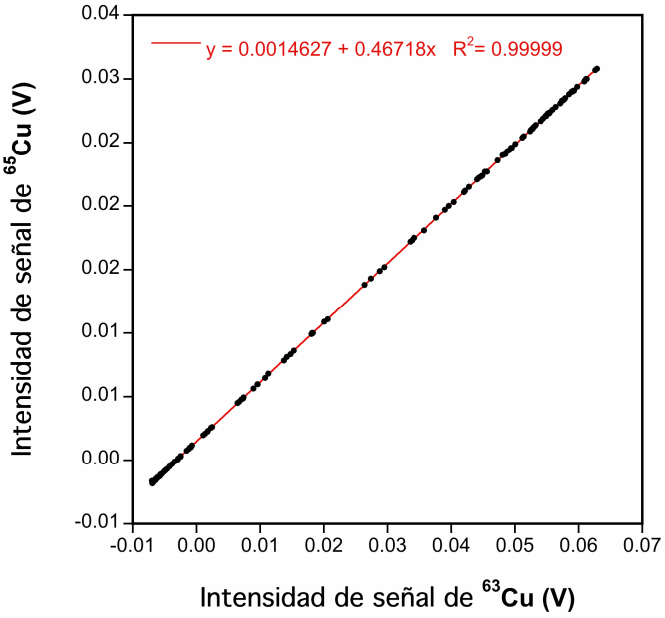
Como puede verse, la señal es relativamente estable (decrece un poco cuando se ablacionan las áreas más interiores, como era de esperar por la menor cantidad de cobre presente en dichas áreas) y la introducción de la matriz en el interior del plasma va acompañada por una supresión de la señal, lo que viene indicado claramente por la caída en el valor de la intensidad de la señal del níquel.

La forma tradicional de procesar estos datos sería utilizar un método de punto por punto, donde la relación $^{65}Cu/^{63}Cu$ para cada medida (1 valor cada 5 segundos) se calcula utilizando las intensidades de las señales (corregidas de la señal del blanco) obtenidas para el ^{65}Cu y el ^{63}Cu. La relación $^{62}Ni/^{61}Ni$ se calcula del mismo modo y, con este dato, finalmente se corrige el sesgo de masa aplicando la ley exponencial de Russel para obtener la relación $^{65}Cu/^{63}Cu$ corregida para cada punto individual. Este es el procedimiento que aparece ilustrado en la Figura III.6.4, donde se representan todos los valores $^{65}Cu/^{63}Cu$. Obviamente, esta estrategia parece funcionar aceptablemente, ya que la relación corregida proporciona un valor mucho más cercano al natural que el de la medida sin corregir. Finalmente, la relación $^{65}Cu/^{63}Cu$ definitiva puede estimarse como la media obtenida durante la duración de cada señal transitoria, lo que puede calcularse tras fijar los límites dentro de los cuales se procesa cada medida. Normalmente, de cada replica de la señal $^{65}Cu/^{63}Cu$ se utiliza la parte estable en torno al máximo, aunque siempre hay cierta incertidumbre en la forma de fijar estos límites, lo que puede afectar a los resultados obtenidos.

Sin embargo existe un tratamiento alternativo, específicamente diseñado para las señales transitorias cortas que se obtienen típicamente por medio de *LA-ICP-MS* con detectores multicolectores, que fue propuesto por Fietzke *et al*. [49,50]. La base del mismo es representar las intensidades de la señal de ^{65}Cu frente a la intensidad de la señal de ^{63}Cu, de forma que la pendiente de la curva de regresión proporciona directamente la relación ^{65}Cu/^{63}Cu bruta, de la que posteriormente puede corregirse el sesgo de masa aplicando la ley exponencial de Russell utilizando el valor medio de la relación ^{62}Ni/^{61}Ni medido durante el mismo periodo.

Esta sencilla aproximación proporciona ventajas significativas en esta situación puesto que utiliza todos los datos, evitando cualquier influencia subjetiva que puede producirse cuando se fijan los límites de la señal. Pero, quizás, su principal ventaja es que, por la propia naturaleza del ajuste de mínimos cuadrados, cada dato puntual contribuye al ajuste dependiendo de su intensidad de señal (los valores de alta intensidad tendrán más influencia en la pendiente final que los valores de baja intensidad), mientras que en la aproximación clásica de punto por punto todos ellos contribuyen en la misma medida, salvo que sean excluidos. La Figura III.6.5 muestra la aplicación de esta aproximación al mismo conjunto de datos utilizados en la III.6.4.

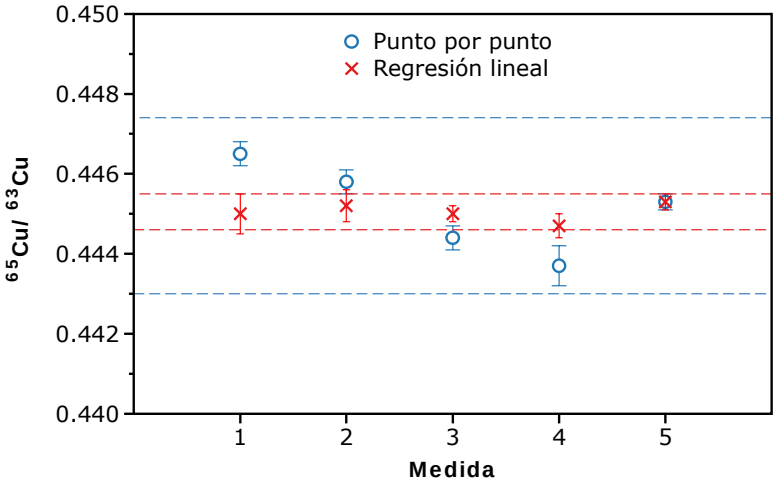
Figura III.6.5. Representación de las intensidades de la señal de ^{65}Cu frente a la de ^{63}Cu para el mismo conjunto de medidas brutas que las presentadas en la Figura III.6.4.



Como puede observarse, el ajuste lineal que se obtiene es excelente y la pendiente proporciona la relación ^{65}Cu/^{63}Cu sin corregir. Con objeto de obtener una estimación de la imprecisión, las señales obtenidas para cada una de las cinco coronas ablacionadas a partir de cada *PS-DUS* se procesaron por separado, usando intervalos constantes de tiempo (200 s), con lo que se obtuvieron cinco réplicas por cada muestra.

Para evaluar las dos formas de tratamiento de la señal transitoria descritas anteriormente, se prepararon cinco *PS-DUS* con la orina de un paciente de la enfermedad de Wilson y se realizó su análisis mediante *LA-ICP-MS* con detectores multicolectores en diferentes sesiones de trabajo, utilizando ambas aproximaciones para el cálculo de la relación isotópica del cobre. Los resultados obtenidos se muestran en la Figura III.6.6.

Figura III.6.6. Comparación de los resultados obtenidos para la relación isotópica corregida del cobre sobre cinco *PS-DUS,* con el tratamiento punto a punto y con el de la pendiente de la recta de regresión.



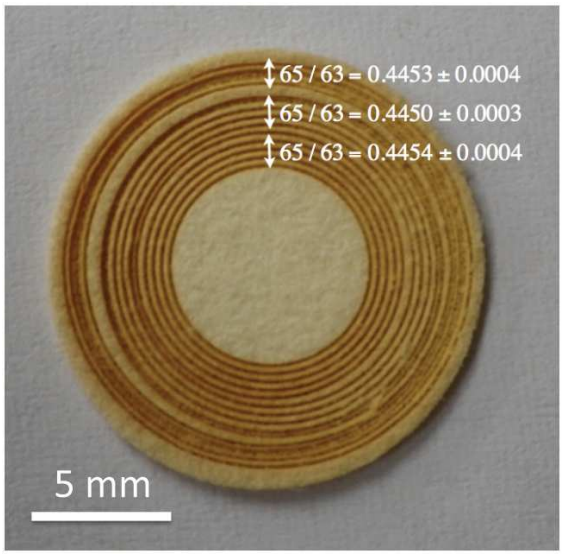
Los valores de imprecisión se expresan como dos veces la desviación estándar de cinco réplicas.
Las líneas horizontales discontinuas indican la imprecisión de los valores medios de los cinco *PS-DUS*.

La precisión interna [42] obtenida por medio de ambas estrategias es similar (valores de DSR que oscilan entre 200 y 500 ppm para cinco réplicas), pero la precisión externa (entendida como la variación entre varias sesiones) obtenida por medio de la regresión lineal es unas cinco veces menor que cuando se trabaja punto a punto (DSR de 540 ppm frente a 2480 ppm, respectivamente); la simple observación de la Figura III.6.6 permite apreciar con claridad la mejor reproducibilidad de la aproximación mediante la regresión lineal. Esta diferencia es estadísticamente significativa para un intervalo de confianza del 95% (F_{valor} = 20.810; $F_{crítico}$ = 6.388).

En conclusión, los resultados obtenidos con el método de la regresión lineal parecen más consistentes por lo que esta metodología fue la que se seleccionó para el análisis de las muestras reales. Estos resultados también sirven para proporcionar una idea de la reproducibilidad que cabe esperar del método en el análisis de dichas muestras preparadas como *PS-DUS*.

Finalmente, se investigó la posible influencia de la posición del muestreo en la relación $^{65}Cu/^{63}Cu$ obtenida. Como puede verse en la Figura III.6.7, no parece haber ninguna diferencia significativa entre las distintas zonas, por lo que se prefirió realizar la ablación de coronas en el borde del *PS-DUS* puesto que es la forma de obtener la mejor sensibilidad posible.

Figura III.6.7. Relación isotópica del cobre en distintas zonas del *PS-DUS*.



III.6.4. Análisis de las muestras.

Los resultados obtenidos en la sección previa parecen suficientemente prometedores para acometer el análisis de muestras reales. Sin embargo, dado que no existe información en la literatura sobre estas determinaciones, no se tiene una idea previa sobre el nivel de precisión que debe alcanzarse para que las mismas puedan servir como diagnóstico de la enfermedad de Wilson. Asimismo, es necesario dejar constancia de que, aunque en todo el apartado se han utilizado como herramienta de evaluación los valores absolutos para la relación $^{65}Cu/^{63}Cu$, el objetivo de este trabajo no es la obtención de dichos valores absolutos (para lo que, por otra parte, necesitaría usarse un material de referencia con un contenido isotópico certificado para el níquel), sino establecer si existe alguna diferencia significativa en la relación isotópica del cobre entre los pacientes afectados por la enfermedad de Wilson y los que no lo están. Por ello, a partir de aquí, los resultados se expresan como valores delta, esto es, como la diferencia relativa (en tanto por mil) con relación a una referencia.

$$\delta = 1000 \frac{\left(^{65}Cu/^{63}Cu\right)_{medido} - \left(^{65}Cu/^{63}Cu\right)_{referencia}}{\left(^{65}Cu/^{63}Cu\right)_{referencia}}$$

El análisis de las muestras (*PS-DUS*) se llevó a cabo en las condiciones descritas en el Apartado II.5.9. Dichas muestras pueden dividirse en tres categorías:

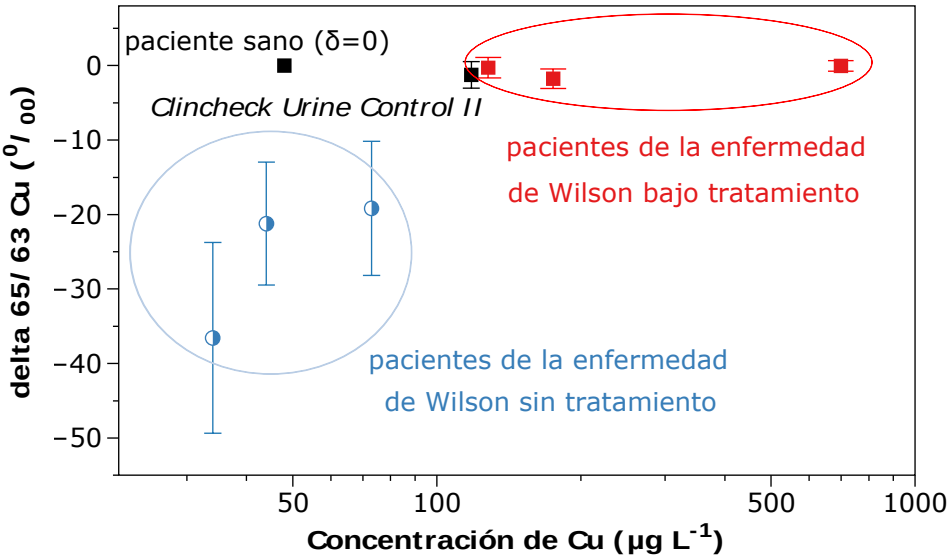
1) Las seleccionadas como controles, (muestras etiquetadas como "Normal") correspondientes a una orina de referencia (*Clincheck Level II*) y a una muestra de un paciente que no presenta la enfermedad de Wilson, pero que tenía un nivel de cobre en orina (44 µg L^{-1}) similar al encontrado en los afectos de dicha enfermedad antes de que fueran sometidos a ningún tipo de tratamiento. La relación $^{65}Cu/^{63}Cu$ obtenida experimentalmente para esta última muestra se seleccionó como referencia para el calculo de los deltas para el resto de las muestras (representando, así, el valor cero de delta).

2) Muestras de pacientes diagnosticados tiempo atrás de la enfermedad de Wilson y que venían siguiendo un tratamiento con penicilamina (etiquetados como "bajo tratamiento").

3) Muestras de personas enfermas de la enfermedad de Wilson que todavía no seguían ningún tipo de tratamiento, puesto que las muestras de orina analizadas en este trabajo se recogieron en el momento de realizar el diagnóstico (etiquetados como "sin tratamiento").

Para cada una de las muestras se realizaron cinco réplicas y los resultados obtenidos se presentan en la Figura III.6.8.

Figura III.6.8. Relación isotópica del cobre *versus* concentración del mismo en orina en los *PS-DUS* para los distintos pacientes analizados.



La incertidumbre (barras de error) se expresa como dos veces la desviación estándar de las cinco réplicas realizadas sobre cada muestra.

Como era de esperar, las muestras denominadas "normales" proporcionaron valores muy próximos a la abundancia relativa natural y, lo que es más interesante, las muestras de pacientes afectos de la enfermedad de Wilson que estaban bajo tratamiento con penicilamina también mostraron una relación isotópica muy similar, conduciendo a bajos valores de delta (desde -0.06 $^{0}/_{00}$ hasta -1.8 $^{0}/_{00}$) que se solapan con el valor cero si se tienen en cuenta las incertidumbres.

Este comportamiento se explica teniendo en cuenta que con la adición del agente quelante se pretende la liberación del cobre de los órganos en los que se ha ido acumulando como consecuencia de la enfermedad. Así, estos pacientes están excretando a través de la orina la mayoría del cobre que puedan obtener de la dieta y parte del que hayan ido acumulando en los tejidos; en consecuencia, sus niveles de cobre en orina son más altos de lo normal y no parece que la relación $^{65}Cu/^{63}Cu$ presente fraccionamiento.

Sin embargo, aquéllos afectos de la enfermedad de Wilson que todavía no han recibido ningún tipo de tratamiento, muestran una relación $^{65}Cu/^{63}Cu$ significativamente más baja, que llevan a valores de delta que oscilan entre -20 $^{0}/_{00}$ y -35 $^{0}/_{00}$, indicando que, como consecuencia de la enfermedad, existe fraccionamiento entre el cobre que es metabolizado y excretado naturalmente a través de la orina, y el cobre que es ingerido. Es necesario subrayar que el análisis isotópico del cobre permite diferenciar claramente este último grupo de

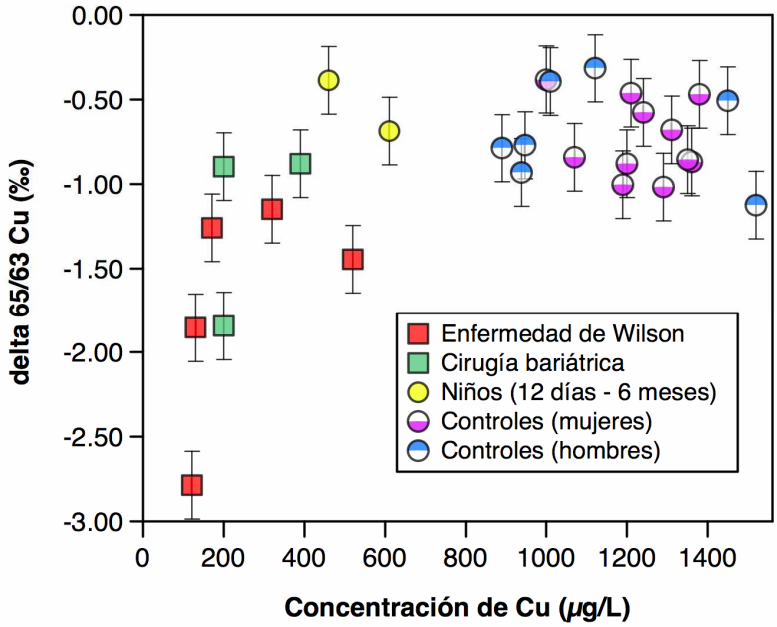
muestras de la utilizada como referencia (δ=0), mientras que si sólo se hubiese realizado un análisis elemental, esta muestra de referencia (44 µg de Cu L^{-1}) podría haberse clasificado como potencialmente proveniente de un paciente afecto de la enfermedad de Wilson puesto que su concentración en orina es similar y algo superior a la de las personas sanas.

También puede observarse en la Figura III.6.8 que la incertidumbre de los resultados varía con el contenido de cobre en las muestras, alcanzando valores de DSR de hasta 2000-6000 ppm para las correspondientes a los pacientes de la enfermedad de Wilson que todavía no estaban bajo tratamiento. Esto es una consecuencia directa de la baja intensidad de señal obtenida para estas muestras, de tan solo unos 10 mV. Hay que hacer notar que cuando se considera la corona más grande para estas muestras (15 mm – 14.7 mm de diámetro), la cantidad de cobre introducida en el plasma durante los 100 s de ablación era inferior a 250 pg. De aquí que, para estas bajas señales, el tratamiento de datos mediante la estrategia de regresión lineal es particularmente eficiente comparada con el método convencional de punto a punto [50], mejorando la precisión en niveles de señal próximos al límite de detección, como demostraron Epov *et al.* [51]. Sin embargo, es deseable mejorar este aspecto clave y futuros trabajos deben encaminarse a la obtención de mayor sensibilidad y, por ende, de una mejor precisión.

En conclusión, aun con la limitación anterior y teniendo presente que el número de muestras estudiado en esta investigación fue pequeño, este trabajo parece confirmar que el análisis isotópico del cobre en orina en un *PS-DUS* puede ayudar a facilitar el diagnóstico de la enfermedad de Wilson, diferenciando las personas afectas de las sanas y, por tanto, podría convertirse en una herramienta poderosa para un diagnóstico más temprano de dicha enfermedad.

En este sentido, como comprobación de que la enfermedad de Wilson provoca un fraccionamiento isotópico del cobre, cabe señalar que se realizó un trabajo adicional empleando un sistema de medida más clásico, pero que no resulta adecuado para realizar un proceso de *screening*, basado en: 1) obtención de sangre de los pacientes; 2) transformación de las muestras en suero; 3) digestión de la muestra y separación del cobre de la matriz mediante cromatografía en columna rellena con una resina; 4) elución y medida de la disolución resultante mediante *ICP-MS* con detectores multicolectores. Este esquema de trabajo, que proporciona una precisión netamente superior (DSR de aproximadamente 200 ppm) al basado en los *PS-DUS*, también confirmó la existencia de fraccionamiento isotópico para pacientes de la enfermedad de Wilson tal y como se muestra en la Figura III.6.9.

Figura III.6.9. Relación isotópica del cobre *versus* concentración del mismo en sangre de distintos pacientes.



La incertidumbre (barras de error) se expresa como dos veces la desviación estándar de tres réplicas realizadas sobre una única muestra.

Como se puede apreciar en la citada figura, de nuevo el contenido total de cobre no resulta un indicador fiable, ya que los niños presentan un nivel similar a los pacientes de la enfermedad de Wilson, pero la relación isotópica del cobre permite establecer una diferencia entre ambos. Tan sólo los pacientes de cirugía bariátrica podrían confundirse con la enfermedad de Wilson debido a su relación $^{65}Cu/^{63}Cu$ menor que la natural. Sin embargo, este hecho no supone un problema de diagnostico (desde luego, en niños), aunque indica que la cirugía bariátrica afecta de forma clara al mecanismo de absorción de metales por parte del organismo.

III.6.5. Conclusiones

Mediante la medida de la relación isotópica $^{65}Cu/^{63}Cu$ en la orina retenida en un *DUS*, se ha desarrollado un procedimiento que ayude a detectar a las personas afectadas por la enfermedad de Wilson. Para lograrlo se ha utilizado el sistema de deposición de la orina desarrollado en apartados anteriores (difusión limitada por deposición en papel de filtro precortado situado sobre una superficie hidrófoba) y la capacidad de análisis isotópico de la técnica de *LA-ICP-MS*.

Para conseguir una sensibilidad que permita medir con suficiente seguridad a los dos isótopos del cobre ha sido necesaria la conjunción de diversos factores: 1) el uso de un láser de femtosegundo operando a alta frecuencia de repetición (10,000 Hz) que permite la ablación de superficies relativamente grandes en un tiempo muy reducido, con lo que se incrementa notablemente la relación señal/ruido de fondo; 2) el sistema ya descrito de deposición de orina en el papel clínico (en este trabajo se utilizó papel blanco para evitar la posible contaminación por cobre proveniente de la tinta de las marcas), que proporciona el máximo contenido posible de orina por unidad de superficie; y 3) realizar la ablación en regiones cercanas al límite del *DUS* puesto que, como se indicó en el apartado anterior, la

concentración del cobre (como la de todos los elementos estudiados) es mayor en esta zona y se comprobó que en la misma no se produce fraccionamiento isotópico.

También ha sido necesario un cuidadoso estudio de las condiciones de medida. Así, se ha trabajado en el modo de *pseudo* alta resolución de los detectores multicolectores para evitar el solapamiento espectral de $^{40}Ar^{23}Na^{+}$ y $^{63}Cu^{+}$ y se ha utilizado níquel como patrón interno (relación isotópica $^{62}Ni/^{61}Ni$) para compensar la discriminación no espectral de masa del cobre. La relación $^{65}Cu/^{63}Cu$ de las señales transitorias medidas se obtuvo por el método de la pendiente de la línea de regresión entre ambos isótopos.

Mediante el procedimiento propuesto fue posible observar diferencias en las relaciones $^{65}Cu/^{63}Cu$ medidas en la orina de los pacientes de enfermedad de Wilson que todavía no habían sido tratados (relación $^{65}Cu/^{63}Cu$ menor que la natural), en comparación con aquéllos que estaban bajo tratamiento de un agente quelante, que mostraban aproximadamente el valor de la abundancia relativa natural, como ocurría con las muestras de control.

Estos resultados sugieren que este procedimiento puede ser la base para un método no-invasivo de *screening* de la enfermedad de Wilson, que requiere tan sólo unos cientos de µL de orina del paciente en un *DUS* que puede preparar él mismo, a la vez que se permite el fácil almacenamiento y transporte de los especímenes (*PS-DUS*) a centros de referencia, objetivo primario perseguido en todos los trabajos analíticos desarrollados en esta Tesis.

III.6.6. Bibliografía

[1] M.E. Letelier, S. Sánchez-Jofré, L. Peredo-Silva, J. Cortés-Troncoso, P. Aracena-Parks. Mechanisms underlying iron and copper ions toxicity in biological systems: Pro-oxidant activity and protein-binding effects. *Chem.-Biol. Interac.*, 2010, 188, 220–227.

[2] H. Kodama, C. Fujisawa. Copper metabolism and inherited copper transport disorders: molecular mechanisms, screening, and treatment. *Metallomics*, 2009, 1, 42–52.

[3] J.R. Prohaska, A.A. Gybina. Intracellular copper transport in mammals. *J. Nutr.*, 2004, 134 1003–1006.

[4] C. Wijmenga, L.W.J. Klomp. Molecular regulation of copper excretion in the liver. *Proc. Nutr. Soc.*, 2004, 63, 31–39.

[5] A. Ala, A.P. Walker, K. Ashkan, J.S. Dooley, M.L. Schilsky. Wilson's disease. *Lancet*, 2007, 369, 397–408.

[6] S. La Fontaine, J.F.B. Mercer. Trafficking of the copper-ATPases, ATP7A and ATP7B: Role in copper homeostasis. *Arch. Biochem. Biophys.*, 2007, 463, 149–167.

[7] J.D. Gitlin. Wilson Disease. *Gastroenterology*, 2003, 125, 1868–1877.

[8] M.L. Schilsky. Wilson disease: Current status and the future. *Biochimie*, 2009, 91, 1278–1281.

[9] W.A. Gahl. Newborn screening for Wilson Disease: Does liquid chromatography-tandem mass spectrometry provide the solution? *Clin. Chem.*, 2008, 54, 1941–1942.

[10] European association for study of the liver. EASL Clinical Practice Guidelines: Wilson's disease. *J. Hepatol.*, 2012, 56, 671–685.

[11] C. Kroll, M. Ferber, B. Dawson, R. Jacobson, K. Mensink, F. Lorey, J. Sherwin, G. Cunningham, P. Rinaldo, D. Matern, S.H. Hahn. Retrospective determination of ceruloplasmin in newborn screening blood spots of patients with Wilson disease. *Mol. Gen. Metab.*, 2006, 89, 134–138.

[12] P. Ferenci, K. Caca, G. Loudianos, G. Mieli-Vergani, S. Tanner, I. Sternlieb, M. Schilsky, D. Cox, F. Berr. Diagnosis and phenotypic classification of Wilson disease. *Liver Int.*, 2003, 23, 139–142.

[13] H. Kodama, C. Fujisawa, W. Bhadhprasit. Pathology, clinical features and treatments of congenital copper metabolic disorders - Focus on neurologic aspects. *Brain Dev.*, 2011, 33, 243–251.

[14] A.M. Sutton, A. Harvie, F. Cockburn, J. Farquharson, R.W. Logan. Copper deficiency in the preterm infant of very low birthweight. Four cases and a reference range for plasma copper. *Arch. Dis. Child.*, 1985, 60, 644–

651.

[15] K.H. Schulpis, T. Karakonstantakis, S. Gavrili, C. Costalos, E. Roma, I. Papassotiriou. Serum copper is decreased in premature newborns and increased in newborns with hemolytic jaundice. *Clin. Chem.*, 2004, 50, 1253–1256.

[16] Y. Yamaguchi, T. Aoki, S. Arashima, T. Ooura, G. Takada, T. Kitagawa, Y. Shigematsu, M. Shimada, M. Kobayashi, M. Itou, F. Endo. Mass screening for Wilson's disease: Results and recommendations. *Pediatr. Int.*, 1999,41, 405–408.

[17] F. Vanhaecke, P. Degryse, Eds. Isotopic Analysis: Fundamentals and Applications Using ICP-MS. Wiley-VCH, Weinheim, 2012.

[18] F. Albarède, P. Telouk, A. Lamboux, K. Jaouen, V. Balter. Isotopic evidence of unaccounted for Fe and Cu erythropoietic pathways. *Metallomics*, 2011, 3, 926–933.

[19] F. Larner, M. Rehkämper, B.J. Coles, K. Kreissig, D.J. Weiss, B. Sampson, C. Unsworth, S. Strekopytov. A new separation procedure for Cu prior to stable isotope analysis by MC-ICP-MS. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, 26, 1627–1632.

[20] K. Hotz, H. Augsburger, T. Walczyk. Isotopic signatures of iron in body tissues as a potential biomarker for iron metabolism. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, 26, 1347–1353.

[21] L. Van Heghe, E. Engström, I. Rodushkin, C. Cloquet, F. Vanhaecke. Isotopic analysis of the metabolically relevant transition metals Cu, Fe and Zn in human blood from vegetarians and omnivores using multi-collector ICP-mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2012, 27 1327–1334.

[22] A. Almeida, J. Lima. Optimized conditions and analytical performance for the determination of Cu in serum and urine samples using a single GFAAS procedure. *At. Spectrosc.*, 2001, 22, 324–330.

[23] M. Van Caillie-Bertrand, H.J. Degenhart, I. Luijendijk, J. Bouquet, M. Sinaasappel. Wilson's disease: assessment of D-penicillamine treatment. *Arch. Dis. Child.*, 1985, 60, 652–655.

[24] E.A. Roberts, M.L. Schilsky. Diagnosis and treatment of Wilson disease: An update. *Hepatology*, 2008, 47, 2089–2111.

[25] I. Horn, F. von Blanckenburg. Investigation on elemental and isotopic fractionation during 196 nm femtosecond laser ablation multiple collector inductively coupled plasma mass spectrometry. *Spectrochim. Acta Part B.*, 2007, 62, 410–422.

[26] J. Gonzalez, D. Oropeza, X. Mao, R. Russo. Assessment of the precision and accuracy of thorium (^{232}Th) and uranium (^{238}U) measured by quadrupole based inductively coupled plasma-mass spectrometry using liquid nebulization, nanosecond and femtosecond laser ablation. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 2008, 23, 229–234.

[27] J. Gonzalez, S.H. Dundas, C. Yi Liu, X. Mao, R.E. Russo. UV-femtosecond and nanosecond laser ablation-ICP-MS: internal and external repeatability. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 2006, 21, 778–784.

[28] K. Ikehata, K. Notsu, T. Hirata. In situ determination of Cu isotope ratios in copper-rich materials by NIR femtosecond LA-MC-ICP-MS. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 2008, 23, 1003–1008.

[29] J. Koch, D. Günther. Femtosecond laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: achievements and remaining problems. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2006, 387, 149–153.

[30] F. Vanhaecke, M. Resano, J. Koch, K.S. McIntosh, D. Günther. Femtosecond laser ablation-ICP-mass spectrometry analysis of a heavy metallic matrix: Determination of platinum group metals and gold in lead fire-assay buttons as a case study. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 2010, 25, 1259–1267.

[31] J. Koch, D. Günther. Review of the state-of-the-art of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry. *Appl. Spectrosc.*, 2011, 65, 155A–162A.

[32] C. Pécheyran, S. Cany, P. Chabassier, E. Mottay, O.F.X. Donard. High repetition rate and low energy femtosecond laser ablation coupled to ICPMS detection: a new analytical approach for trace element determination in solid samples. *J. Phys.: Conf. Ser.*, 2007, 59, 112–117.

[33] G. Ballihaut, F. Claverie, C. Pécheyran, S. Mounicou, R. Grimaud, R. Lobinski. Sensitive detection of selenoproteins in gel electrophoresis by high repetition rate femtosecond laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry. *Anal. Chem.*, 2007, 79, 6874–6880.

[34] E. Ricard, C. Pécheyran, G. Sanabria Ortega, A. Prinzhofer, O.F.X. Donard. Direct analysis of trace elements in crude oils by high-repetition-rate femtosecond laser ablation coupled to ICPMS detection. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, 399, 2153–2165.

[35] B. Fernández, F. Claverie, C. Pécheyran, O.F.X. Donard. Direct analysis of solid samples by fs-LA-ICP-MS. *Trends Anal. Chem.*, 2007, 26, 951–966.

[36] F. Claverie, B. Fernández, C. Pécheyran, J. Alexis, O.F.X. Donard. Elemental fractionation effects in high repetition rate IR femtosecond laser ablation ICP-MS analysis of glasses. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2009, 24, 891–902.

[37] M. Berglund, M.E. Wieser. Isotopic compositions of the elements 2009 (IUPAC Technical Report). *Pure Appl. Chem.*, 2011, 83, 397–410.

[38] F. Vanhaecke, L. Balcaen, D. Malinovsky. Use of single-collector and multi-collector ICP-mass spectrometry for isotopic analysis. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 2009, 24, 863–886.

[39] L. Yang. Accurate and precise determination of isotopic ratios by MC-ICP-MS: A review. *Mass Spectrom. Rev.*, 2009, 28, 990–1011.

[40] C. O'Connor, B.L. Sharp, P. Evans. On-line additions of aqueous standards for calibration of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: theory and comparison of wet and dry plasma conditions. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, 21, 556–565.

[41] M. Resano, M.P. Marzo, R. Alloza, C. Saénz, F. Vanhaecke, L. Yang, S. Willie, and R.E. Sturgeon. Laser ablation single-collector inductively coupled plasma mass spectrometry for lead isotopic analysis to investigate evolution of the Bilbilis mint. *Anal. Chim. Acta.*, 2010, 677, 55–63.

[42] M. Aramendía, M. Resano, F. Vanhaecke. Isotope ratio determination by laser ablation-single collector-inductively coupled plasma-mass spectrometry. General capabilities and possibilities for improvement. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2010, 25, 390–404.

[43] C.N. Maréchal, P. Telouk, F. Albarède. Precise analysis of copper and zinc isotopic compositions by plasma-source mass spectrometry. *Chem. Geol.*, 1999, 156, 251–273.

[44] S.E. Jackson, D. Günther. The nature and sources of laser induced isotopic fractionation in laser ablation-multicollector-inductively coupled plasma-mass spectrometry. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 2003, 18, 205–212.

[45] S. Graham, N. Pearson, S. Jackson, W. Griffin, S.Y. O'Reilly. Tracing Cu and Fe from source to porphyry: in situ determination of Cu and Fe isotope ratios in sulfides from the Grasberg Cu–Au deposit. *Chem. Geol.*, 2004, 207, 147–169.

[46] W. Li, S. Jackson, N. Pearson, O. Alard, B. Chappell. The Cu isotopic signature of granites from the Lachlan Fold Belt, SE Australia. *Chem. Geol.*, 2009, 258, 38–49.

[47] F. Vanhaecke, L. Moens. Overcoming spectral overlap in isotopic analysis via single-and multi-collector ICP–mass spectrometry. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, 378, 232–240.

[48] G.H. Fontaine, K. Hametner, A. Peretti, D. Günther. Authenticity and provenance studies of copper-bearing andesines using Cu isotope ratios and element analysis by fs-LA-MC-ICPMS and ns-LA-ICPMS. *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, 398, 2915–2928.

[49] J. Fietzke, M. Frische, T.H. Hansteen, A. Eisenhauer, A simplified procedure for the determination of stable chlorine isotope ratios (δ^{37}Cl) using LA-MC-ICP-MS. *J. Anal. Atom. Spectrom.*, 2008, 23, 769–772.

[50] J. Fietzke, V. Liebetrau, D. Günther, K. Gürs, K. Hametner, K. Zumholz, T.H. Hansteen, A. Eisenhauer. An alternative data acquisition and evaluation strategy for improved isotope ratio precision using LA-MC-ICP-MS applied to stable and radiogenic strontium isotopes in carbonates. *J. Anal. At. Spectrom.*, 2008, 23, 955–961.

[51] V.N. Epov, S. Bérail, M. Jimenez-Moreno, V. Perrot, C. Pécheyran, D. Amouroux, O.F.X. Donard. Approach to measure isotopic ratios in species using multicollector-ICPMS coupled with chromatography. *Anal. Chem.*, 2010, 82, 5652–5662.

IV. Conclusiones

Se puede considerar que los objetivos propuestos en el inicio de esta Tesis se han cubierto de forma satisfactoria.

1) Se ha demostrado que puede realizarse la determinación directa de elementos en fluidos biológicos depositados sobre un papel clínico (*DMS*) con una precisión acorde con las necesidades clínicas. En general, y salvo algún problema puntual que se ha comentado en las conclusiones del apartado correspondiente, la técnica de medida es similar a la utilizada para determinaciones elementales directas sobre muestras sólidas. El único inconveniente general que puede reseñarse es que en ningún caso se ha conseguido realizar el calibrado con patrones acuosos, siendo necesario utilizar patrones emparejados, lo que por otra parte es habitual en las determinaciones sobre los *DMS*.

2) Además de desarrollar procedimientos con la sangre (*DBS*), se ha conseguido por primera vez realizar determinaciones elementales sobre la orina (*DUS*). Para ello ha sido necesario desarrollar un nuevo sistema de deposición de la muestra sobre el papel clínico (con difusión limitada en el papel debido a su contacto con una superficie hidrófoba), que permite resolver los problemas de baja sensibilidad y distribución inhomogénea de los analitos que se produce si se permite la difusión libre de la orina sobre el papel clínico. El sistema propuesto, aunque menos sencillo que la simple deposición, sigue permitiendo la preparación del *DUS* por el propio paciente.

3) Se han estudiado algunos aspectos de la formación de los *DMS* como la influencia de la cantidad de muestra, del hematocrito en la sangre y, especialmente, la distribución de los analitos en el papel. Sobre este último tema se ha podido obtener información muy detallada mediante la técnica de *LA-ICP-MS* debido a su elevada resolución espacial. Los resultados de estos estudios, que en todos los casos encontraron unas condiciones satisfactorias de trabajo, se han expuesto en las conclusiones de los distintos apartados.

4) Las tres técnicas utilizadas, *GF-AAS* con fuente de línea, *GF-AAS* de alta resolución con fuente continua y *LA-ICP-MS*, han resultado adecuadas para estas determinaciones. La *GF-AAS* de alta resolución con fuente continua, de la que se ha comprobado su capacidad polielemental, parece claramente superior a la convencional sin que su utilización resulte más complicada. Sin duda, la técnica de *LA-ICP-MS* resulta más poderosa por su carácter multielemental pero, debido a su precio y mayor complejidad de utilización, no es previsible la utilización sistemática de la misma mientras la información multielemental que proporciona no sea ampliamente demandada por los laboratorios clínicos. Pese a esto, la capacidad de análisis isotópico de esta técnica ha permitido el desarrollo de un procedimiento para la detección de la enfermedad de Wilson.

5) Todos los procedimientos desarrollados parecen ofrecer buenas características para ser utilizados como etapa de criba en un sistema de *screening*. Esta afirmación se ha comprobado experimentalmente para el caso del plomo en sangre, con resultados satisfactorios.

Anexo.
Artículos publicados

PAPER www.rsc.org/jaas | Journal of Analytical Atomic Spectrometry

Minimally-invasive filter paper test in combination with solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for Pb determination in whole blood

M. Resano,*[a] L. Rello,[b] E. García-Ruiz[a] and M. A. Belarra[a]

Received 9th May 2007, Accepted 12th June 2007
First published as an Advance Article on the web 2nd July 2007
DOI: 10.1039/b706913h

This work describes a simple procedure for the determination of blood lead levels in dried-spot filter paper specimens. The method permits the minimally-invasive collection of blood on filter paper and the subsequent direct analysis of discs punched from these filters by solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry (SS-GFAAS). A systematic study on the possible effects of different factors (total volume of blood deposited onto the filter paper, potential chromatographic effects affecting the distribution of Pb over the surface, potential differences in the amount of blood deposited per surface area for samples with different hematocrit values) was carried out, leading to the conclusion that the variation of these parameters within the usual clinical range does not result in any significant effect on the amount of Pb deposited in each disc. Thus, a simple methodology was developed based on (i) the performance of Pt as a chemical modifier and (ii) the use of matrix-matched standards for calibration (Pb-free blood samples spiked with known amounts of Pb) treated in the same way as the samples. The method was validated by analysis of a reference material, as well as by comparison of the results obtained for 18 patients from which blood was also taken and analyzed following the standard procedure (venous sampling, blood dilution and GFAAS monitoring). The main analytical features of the method proposed are: a detection limit of 2.5 μg Pb L^{-1}, a working range up to 840 μg Pb L^{-1}, a sample throughput of approximately 10 min per sample (5 replicates) and precision values below 10% RSD. The ease of sample collection, transporting and storing, in combination with the expeditiousness and relative inexpensiveness of the analytical technique used, make the procedure investigated very attractive for the screening of children in order to detect those with blood lead levels above the present threshold of concern (100 μg L^{-1}), particularly in countries/areas were collecting sites might be far away from central laboratories.

1. Introduction

The 2005 policy statement of the American Academy of Pediatrics (AAP) dealing with lead exposure in children made the following recommendation for the US government: "Identify all children with excess lead exposure and prevent further exposure to them".[1] This statement clearly indicates the degree of public awareness on this topic. The same document states: "Most US children are at sufficient risk that they should have their blood lead concentration measured at least once." Obviously, this is not a problem only in United States, but a general concern worldwide. Pb may enter biological systems (as Pb^{2+}) *via* food (*e.g.*, contaminated canned food containing Pb solders in the joints), water (*e.g.*, use of lead pipes), air and soil (*e.g.*, the combustion of leaded fuels have contributed to the accumulation of atmospheric and soil Pb).[2] In the US, the major source of ingestion in young children seems to be the dust and chips originating from old lead paint (used from 1884 to 1978).[1,2]

Of course, Pb is a neurotoxin that may affect all the population. However, children are particularly sensitive to it. On the one hand, they may accidentally touch or swallow materials with high Pb content more easily. On the other hand, a greater proportion of ingested lead is absorbed from the gastrointestinal tract of children, a greater proportion of systemically circulating Pb gains access to the brain of children and, moreover, a developing nervous system is more vulnerable to Pb than a mature brain.[3] Nowadays, it is accepted that elevated blood lead levels can result in brain injury, leading to cognitive impairment and even to juvenile delinquent behaviour, among other negative effects.[4–8]

In most countries, blood lead concentrations peak at approximately 2 years of age and then decrease without intervention. Therefore, children between 1 and 2 years should be selected for the measurement of blood lead levels if a screening program (universal or targeted) is to be implemented, as recommended by the AAP.[1] The threshold limit of lead poisoning in children has been established by the Centers for Disease Control and Prevention (CDCP) as 100 μg Pb L^{-1}.[9]

[a] *Department of Analytical Chemistry, University of Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, Spain. E-mail: mresano@unizar.es; Fax: +34 976761290; Tel: +34 976761634*
[b] *Department of Clinical Biochemistry, "Miguel Servet" Universitary Hospital, Paseo Isabel La Católica 1-3, 50009 Zaragoza, Spain.*

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2007

To give an idea of the seriousness of the situation worldwide, recent work estimates that approximately 38% of Chinese children exceed that limit.[10] High Pb levels for children have been reported in other developing countries as well.[11]

From the analytical point of view, efforts are being made to provide rapid, innovative, inexpensive and reliable methods to determine the blood lead levels in children at risk of exposure. One of the methods that may help to implement cost-efficient screening programs is the use of blood spots dried on filter paper (FP). Dried blood spot specimens are clinical samples collected by carefully applying a few drops of blood, freshly drawn by finger or heel stick with a lancet, onto specially manufactured absorbent specimen collection (filter) paper, as illustrated in Fig. 1. This kind of sample is referred to as capillary blood, in contrast with the blood obtained by venipuncture, called venous blood.

Capillary blood collected on filter paper has been used for screening for metabolic diseases in large populations since 1963.[12] The use of this methodology as an alternative to venous blood sampling for lead measurement is also not novel,[13] however, it is still an issue of controversy in medical publications.[14,15] In this respect, the AAP policy statement expresses that the measurement of blood lead concentrations "is best performed by using a venous sample, but a carefully collected finger-stick sample can be used".[1] Regardless of the point of view, it is overtly accepted that the method of collecting capillary blood on filter paper becomes extremely attractive when treating children under 2 years of age. As pointed out elsewhere:[14] "FP-Pb determination is of interest in mass screening of children because of the following potential advantages: (a) a relatively small amount of blood is required; (b) blood collection *via* finger stick is generally easier and less traumatic to children; (c) collection can be performed by a relatively untrained collector; and (d) appropriately prepared FP specimens are stable and can be easily transported to the laboratory". In fact, FP-specimens can be mailed in an envelope.[16] Thus, the use of FP blood specimens may allow to obtain large quantities of samples *in situ* that can be analyzed at a latter stage at the lab, which is an appealing approach for screening large populations in poor or potentially contaminated areas.[10,16]

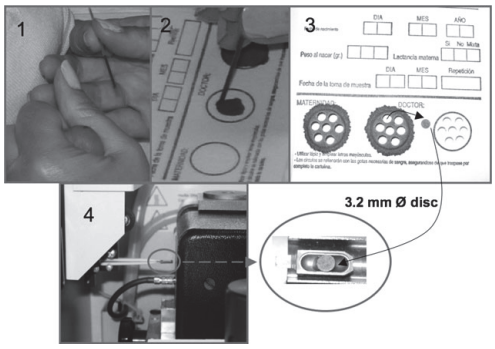


Fig. 1 Different steps for Pb determination in blood from children using the FP-SS-GFAAS approach investigated in this work. (1) Collection of blood from the heel of a child with a capillary. The infant's heel was previously punctured with a sterile lancet. (2) Deposition of blood onto a FP. (3) Picture of three FP spots, with and without sample, after punching out seven of the 3.2 mm Ø discs used for GFAAS analysis from each of them. (4) Introduction of a blood-embedded 3.2 mm Ø disc into the graphite furnace.

However, even though the use of this technique looks appealing for sampling many children in a fast way, it presents a further problem for the analysts: the transformation of a liquid sample (blood) into a solid sample (blood onto FP). Since most analytical techniques are designed to work with solutions, the majority of analytical procedures tested are based on the digestion or extraction of Pb from the filter paper prior to analysis, usually carried out by means of graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) or inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS).[17–19] Of course, during this procedure some problems such as incomplete recovery or contamination, which can be an issue for an element as ubiquitous in the environment such as Pb,[20] may occur.[14,21,22] This may, at least partially, explain why this method is regarded with care in the clinical community.

The use of techniques allowing for the direct determination of Pb in FP may represent an attractive alternative, increasing sample throughput and minimizing risks of losses/contamination. Some early attempts of using solid sampling were made in the seventies, by means of the Delves cup,[23] a simple approach in which the filter paper was inserted into a flame, using a platinum crucible, for the monitoring of the Pb atomic absorption. The success of this approach is still subject to debate.[24,25]

Certainly, there are other analytical techniques nowadays that may be capable of the direct monitoring of Pb from the FP, perhaps offering a more reliable performance. Among them, solid sampling (SS)-GFAAS may be a logical choice, since it is able to provide a high sensitivity, it is relatively inexpensive and its performance for biological samples is well established.[26–29]

The purpose of this work is to evaluate the possibilities of SS-GFAAS as a tool for the determination of lead in blood using dried blood spots.

2. Experimental

2.1 Instrumentation

The measurements of blood lead in dried blood spots were carried out using an AAS 5 EA atomic absorption spectrometer from Analytik Jena AG (Jena, Germany). This instrument is equipped with a transversely heated graphite tube atomizer, an automatic solid sampling accessory SSA 51 (including a Sartorius M2P—Göttingen, Germany—microbalance with a precision of 0.001 mg) and a deuterium continuum source background correction system. Pyrolytic graphite tubes for solid sampling (without dosing hole) were used with this instrument. The samples were introduced using solid sampling platforms. More details on the design of this instrument can be found elsewhere.[30]

The measurements of blood lead in venous samples were carried out using a Perkin-Elmer 4110ZL (Massachusetts,

USA) atomic absorption spectrophotometer, which is equipped with a longitudinal Zeeman background correction system and a transversely heated graphite atomizer. An AS-72 autosampler is used for the introduction of the diluted blood.

2.2 Samples and standards

2.2.1 Standards and reagents. Purified water was obtained from a Milli-Q system (Millipore, Billerica, USA). Pb, Pt, Rh and Pd solutions were prepared from commercially available 1 g L^{-1} single-standards (Merck, Darmstadt, Germany), by appropriate dilution with 0.14 M HNO_3, which was purchased from Merck.

Before use, all laboratory material (lancets, needles, Eppendorf tubes, propylene tubes) was soaked for two months in 0.14 M HNO_3. No signal in excess of the blank for lead was obtained in any case when these 0.14 M HNO_3 solutions were measured.

2.2.2 Samples. A certified reference material (CRM) was used to check the performance of the technique. ERM®-CE194 bovine blood was available from IRMM (Institute for Reference Materials and Measurements), Geel, Belgium. It is provided as a lyophilized material which, once reconstituted with 5 mL of deionized water, contains 126 ± 4 μg L^{-1} Pb. Suitable volumes of this CRM were applied to filter paper sheets with a micropipette and processed in the same way as the blood spot specimens.

Capillary finger or heel blood was collected by trained nurses according to the document LA4-A4 by the National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS)[31] and deposited on the filter paper (903® paper, Schleicher & Schuell, Keene, NH, USA). This staff has been drawing capillary blood for neonatal screening purposes for more than 20 years. The Schleicher & Schuell n° 903® paper is a Food and Drug Administration (FDA)-registered *in vitro* Class II medical device, used in virtually all US newborn screening programs and in most newborn screening programs throughout the world. Since it is a medical device, 903® paper must be manufactured and tested according to FDA quality system regulations and must meet some stringent requirements.[31]

Once air dried, the filter paper was punched with an automated puncher (Wallac DBS Puncher 1296-071, Perkin Elmer). Seven 3.2 mm diameter discs were easily punched out from every spot of blood, as can be seen in Fig. 1. These discs were stored in Eppendorf tubes to avoid contamination until analysis.

At the same time of collecting the capillary blood on filter papers, paired venous blood samples were taken using the standard phlebotomy technique.

2.2.3 Preparation of matrix-matched standards for calibration. Matrix-matched standards were prepared by addition of very small quantities of lead solution to venous lead-free blood samples (meaning that the Pb level was below the LOD of the standard method described in Section 2.4). In this way, samples of the required concentration could be produced. In all cases, the volume of lead solution added represented less than 2% of the total blood volume, in order to minimize the modification of the blood matrix. The standards prepared in this way remained in the tube for 24 h in an automated orbital shaker. Afterwards, suitable volumes of these standards were applied onto the filter paper sheets and processed the same way as the samples and the CRM, as described in the next section. Different sets of blood samples were spiked following this procedure, and the slope of the calibration curve obtained after SS-GFAAS monitoring was always very similar.

2.3 Procedure for quantitative determination of Pb in dried blood spots by SS-GFAAS

The solid sampling device used allows for automatic weighing (when necessary) and transporting of the sample discs into the furnace onto a graphite platform, using a pair of tweezers.[30] In this case, 10 μL of the modifier solution (Pt, 5 mg L^{-1}) were dispensed onto the platform with a micropipette. The sample disc was placed onto it, pressing slightly to get an intimate contact between the filter and the solution. Then, the platform containing the sample and the modifier was transferred into the graphite furnace and subsequently subjected to the temperature program. All these operations were fully controlled from a keyboard, except for the deposition of the dried blood spot disc and the modifier onto the platform, which was carried out manually. The operating conditions are summarized in Table 1. After sample atomization, a small compact carbonaceous residue remains on the platform. This residue is easily withdrawn with a needle.

Five replicate measurements (which represents approximately 10 min work) were carried out for each determination and the median was taken as the representative value, in order to minimize the possible influence of outliers.[32] Calibration was carried out against matrix-matched standards, prepared as described above. A calibration curve (three standards and a blank) was measured in the beginning of every working session and, afterwards, the measurements of all the dried blood spot discs were performed. In order to detect and correct for possible drifts in sensitivity, a standard was re-measured after 20 solid sample replicates. Integrated absorbance (Q_A) was selected as the measurement mode in all cases.

Table 1 Instrumental parameters used in the determination of Pb in dried blood spots

Wavelength/nm	217.0
Spectral band pass/nm	0.5
Ar gas flow during atomization/mL min^{-1}	0[a]
Background correction	D_2
Chemical modifier	50 ng Pt
Sample mass/mg	3.2 mm Ø FP disc (≈1.5 mg) embedded in blood (≈0.8 mg)
Temperature program	Temperature/ramp/hold time
Drying step	200 °C/7 °C s^{-1}/35 s
Pyrolysis step	800 °C/100 °C s^{-1}/30 s
Autozero step	800 °C/0 °C s^{-1}/4 s
Atomization step	2000 °C/2000 °C s^{-1}/5 s
Cleaning step	2500 °C/1000 °C s^{-1}/3 s

[a] Linearity up to 450 μg L^{-1}. Mini-flow (0.1 L min^{-1}) could be used to further expand the linear range up to 840 μg L^{-1}.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2007

2.4 Procedure for quantitative determination of Pb in venous blood for comparison purposes

These determinations were carried out at the laboratory of the Miguel Servet Universitary Hospital of Zaragoza, following the usual protocol, described in the 2001 NCCLS C-40A guide[33] and published elsewhere.[34] In short, the blood sample is diluted 10 times in a phosphate matrix modifier containing 0.5% Triton X-100 and 0.2% nitric acid. 12 mL of the diluted sample are introduced into the graphite furnace with the help of an autosampler, for subsequent Zeeman-GFAAS Pb monitoring. The hospital adheres to an International Lead Proficiency Testing Program (Programa Interlaboratorios de Control de Calidad de Plomo en sangre) and performs successfully.

3. Results and discussion

3.1 Pb atomization conditions

In principle, taking into account the amount of blood deposited in every individual disc punched out from the filter paper (see Fig. 1), which is approximately 3 mL,[17,35,36] and the concentration range expected for Pb in blood (from 10 mg L^{-1} to a few hundreds), the method developed should be capable of monitoring from tens to hundreds of picograms of Pb. The most sensitive Pb atomic line, 217.0 nm, was thus selected. It is well known that Pb is a volatile element and, therefore, analyte losses may occur during the pyrolysis step. Since the goal of our work is to use a pyrolysis temperature high enough to remove most organic matrix components, in an attempt to minimize the background, it is thus compulsory to use a chemical modifier capable of stabilizing the analyte.

The use of phosphate as a modifier was very common for diluted blood liquid samples.[34,37–39] However, nowadays platinum group metals (PGMs) are accepted as the most popular chemical modifiers,[40] and according to SS-GFAAS literature they often perform best.[28,41,42] Therefore, the potential of Pd, Pt and Rh as chemical modifiers for Pb was compared, first using Pb aqueous solutions. As can be seen in Fig. 2A, all of them are capable of providing unimodal, well-defined signal profiles for Pb, and similar sensitivity. However, a sharper peak is obtained with Pt, which should lead to shorter integration times (2.5 s are enough) and a better signal-to-noise ratio. Moreover, the signal appears a bit earlier, which is preferable since it reduces the overlap with the background (BG) signal in real samples, as will be shown later.

The amount of modifier should be adequate for the Pb concentration range mentioned above, avoiding the use of very high amounts that could lead to overstabilization issues (e.g., delayed signal, excessive tailing, etc.). This parameter was thus optimized, as shown in Fig. 2B. The range between 10 and 50 ng of Pt was found as optimum. An amount of 50 ng was chosen for further work. Under these conditions, Pb can be efficiently stabilized during the pyrolysis step, up to 1000 1C (see Fig. 3). A characteristic mass of 5 pg was calculated using peak areas, which compares favourably with values from the literature (typically ranging from 9 to 40 pg).[34,37,38]

The corresponding experiments were carried out next in order to establish the potential of the technique for the direct

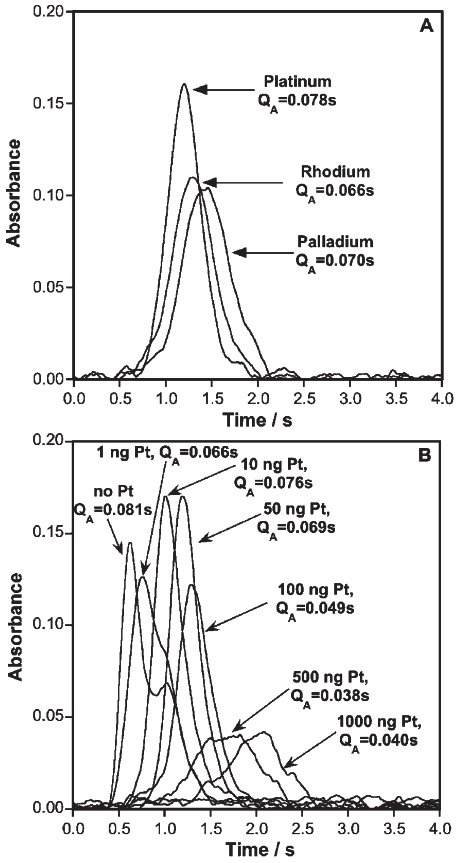


Fig. 2 Comparison of the signal obtained for the atomization of 100 pg of Pb from aqueous standard solutions using the conditions shown in Table 1. (a) Effect of different modifiers (10 ng of each modifier were added). (b) Effect of the amount of Pt added as modifier.

atomization of the dried blood spot discs. Initial results showed poor reproducibility. This was corrected by means of: (a) increasing the temperature of the drying step to 200 1C; 150 1C was satisfactory for aqueous standards but with blood spot discs embedded in the modifier solution a significant sputtering was heard at the beginning of the pyrolysis step, which indicated an insufficient solution removal during the previous drying step; and (b) ensuring adequate placement of the disc onto the platform. By firstly pipetting the modifier solution and then placing the disc onto it and pressing slightly, an intimate contact between the disc and the modifier could be managed and, moreover, the position of the disc into the platform was reproducibly fixed. Otherwise, there is a potential risk for the disc to raise (particularly for blank filter papers), which could lead to some high BG possibly owing to occlusion of the light beam.[43] After these aspects were corrected, the blood spots could be efficiently vaporized. The only negative effect detected was the deposition of a small,

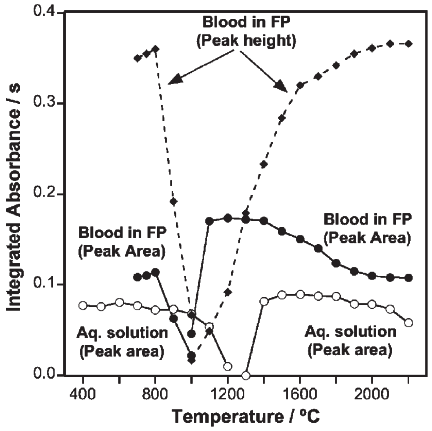


Fig. 3 Atomization and pyrolysis curves for a Pb solution (100 pg) and for dried blood spots prepared from a real blood sample (86 mg Pb L^{-1}, approx. 275 pg Pb per sample disc monitored). For the pyrolysis curves, an atomization temperature of 2000 1C was selected, while for the atomization curves the pyrolysis temperature was fixed at 800 1C.

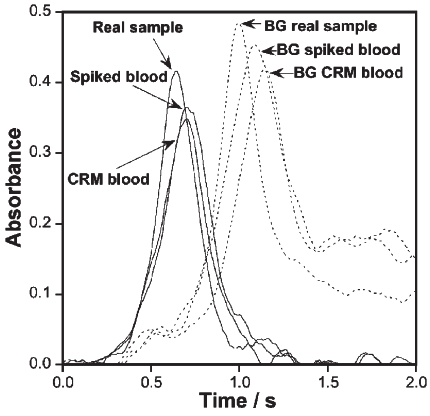


Fig. 4 Comparison of the signal profiles obtained for different blood samples using FP-SS-GFAAS: a real sample (132 mg Pb L^{-1}, Q_A = 0.142 s), a Pb-free sample spiked with a known amount of Pb (130 mg Pb L^{-1}, Q_A = 0.133 s) and a CRM, namely ERM^s-CE194 bovine blood (126 mg Pb L^{-1}, Q_A = 0.125 s).

compact carbonaceous residue after vaporization of every sample. This can be considered as typical for this kind of sample,[37,43] and poses no real problem since these residues are not attached to the platform and can be easily removed with a needle.

When testing the performance of the three PGM modifiers with blood spot discs, the same conclusions discussed above could be drawn. Pt also provided the sharpest peak profile. However, a difference with solution results could be clearly appreciated. It seems that Pb volatility is much higher when it is directly atomized from these blood-embedded discs. Fig. 3 shows a comparison of the pyrolysis curves obtained for solutions and for blood spot discs. In the latter case, Pb losses occur at pyrolysis temperatures higher than 800 1C. This is actually not problematic, since the use of a pyrolysis temperature in the range 700–800 1C seems to be enough for the vaporization of most of the matrix, as observed by smoke coming out of the tube. The use of a lower pyrolysis temperature is clearly not sufficient, giving rise to very high BG levels and hardly reproducible Pb signals. For this reason, temperatures below 700 1C are not represented in the Figure in the case of FP curves.

Pb also atomizes earlier from the FP discs. However, the signals obtained for low atomization temperatures, in spite of providing a higher area, are poorly defined, showing excessive tailing. Peak height values for these sample discs are also shown in Fig. 3 to illustrate this aspect. The signals are best defined for atomization temperatures from 1900 1C on. A value of 2000 1C was thus selected for further work.

The conditions finally selected are shown in Table 1. Fig. 4 shows an example of typical Pb signal profiles obtained for FP discs in which a real blood sample, a blood CRM and a Pb-free blood sample spiked with a known amount of Pb have been deposited. As can be seen, BG is significant, but only slightly overlaps with the Pb signal profile. The quality of the results that will be presented in forthcoming sections indicates that D_2 correction is sufficient for this BG level.[44] The reproducibility for different discs punched from the same FP usually varied between 12 and 18%, which is typical for SS-GFAAS applications and gives an indication of the level of homogeneity in the Pb distribution onto the FP.[45] Of course, the variation between the means or the medians of 5 replicates is much lower, as will be shown in Section 3.4.1. and for that reason carrying out 5 replicates per sample is recommended.

3.2 Studies of lead blood retention on the filter paper

As shown in Fig. 1, the whole blood spot (15 mm Ø) is too large for its complete introduction into a graphite furnace. Therefore, once air-dried it is necessary to punch the filter paper to obtain smaller discs of constant dimensions that could be directly introduced into the furnace. There are different commercially available punchers that are used for clinical purposes, capable of providing 6.0, 4.7 or 3.2 mm Ø discs. Only the discs of smaller diameter (3.2 mm) are suitable to fit into the platform and be easily transported to the atomizer and, thus, this size was selected in this work. A blood spot from a real sample should contain an amount of blood slightly exceeding 50 mL when filling the whole area inside the circle. It is easy to punch at least 7 of these 3.2 mm Ø discs out of it.

Since only a portion of sample will be actually analyzed, it is very important to ascertain the possible influence of different parameters on the amount of blood that will be finally sampled in the furnace. In principle, the ideal situation would be that the amount of Pb retained per cm^2 of filter paper will only be dependent (lineally) on the Pb concentration of the blood sample spotted onto it, and independent of the rest of parameters (such as total volume deposited, level of

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2007

hematocrit or exact location from which the discs are punched). There is some controversy in the medical literature about the degree to which this requirement is fulfilled.[14,15,21] In this work, we have the advantage of being capable of directly analyzing the discs, thus avoiding the possible influence of any digestion/extraction procedure on the final results. Therefore, the effect of different parameters was systematically investigated.

3.2.1 Reproducibility of blood retention per disc. Investigation of the potential influence of the total volume of blood deposited onto the filter paper. Firstly, a study on the reproducibility of the weight of the discs punched from the FP, both in the absence (blank discs) and in the presence of different volumes of blood, was carried out. For this experiment 5 blood samples of different concentrations (in the range 10 to 145 μg L^{-1}, which is the usual range for samples analyzed in the Miguel Servet Hospital) and different hematocrit levels (ranging from 29.7% to 49.0%, which is the typical physiological range) were selected. The total amount of sample deposited onto the FP varied between 50 and 100 μL, which can also be considered as the normal range of variation for real samples. In this regard, it can be said that 100 μL is already a high volume, clearly exceeding the limits of the circle as can be seen in Fig. 5A, so it can be considered as a worse case scenario. Higher volumes will hardly ever be used in practice. Seven discs were punched from every spot, both in blood-containing samples and in blanks. The weighing was made in the microbalance accessory to the spectrophotometer. The values obtained from this experiment are shown in Table 2A and the following conclusions can be derived from it:

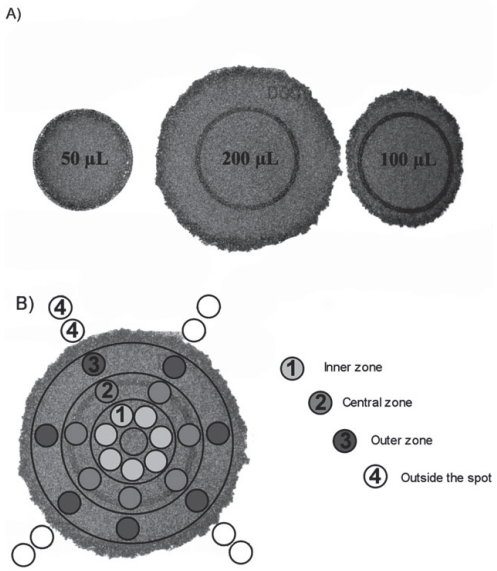


Fig. 5 (A) Dried blood spots resulting from pipetting 50, 200 and 100 μL of the CRM ERM®-CE194 bovine blood. (B) Schematic diagram of the zones into which every spot (prepared by deposition of 200 μL of blood) was divided in order to study the level of homogeneity of the lead distribution.

For the blanks, the values of relative standard deviation (RSD) can be regarded as satisfactory, both for the seven replicates carried out of each paper, with RSDs in the 3–5% range, as well as among the different filter papers (3.7% RSD for $n = 5$), which confirms the reliability of the device used for punching and the suitability of the standard FP used.

The amount of dried blood retained in every disc (which is close to 0.85 mg) also shows a similar degree of reproducibility. The RSDs for the weight of dried-blood discs from the same spot varied between 2.5 and 5% in most cases. The corresponding analysis of variance was carried out demonstrating that there is no significant difference in the amount of blood retained, neither for the different samples checked ($F_{value} = 1.68$, $F_{critical} = 2.47$), nor for the different blood volumes deposited ($F_{value} = 2.36$, $F_{critical} = 3.10$).

Therefore, a first important requisite (sampling of a constant amount of blood) seemed to be fulfilled with the procedure evaluated. The possible influence of the different levels of hematocrit (within the usual physiological range, 30–50%) and/or of the blood volume deposited onto the filter is not statistically significant. The latter is an important issue since, when applying the method to analysis of real samples, the exact volume of blood sampled onto the FP will be unknown.

These results agree with those reported elsewhere.[15,46] However, in order to further confirm these results, since opposite statements can also be found in the literature,[14,21] all of these weighed discs were analyzed by SS-GFAAS, in such a way that a more important parameter could also be evaluated: the amount of Pb retained per disc.

Table 2B shows the values obtained upon SS-GFAAS analysis of these discs. Again, the values achieved suggest that the variability of the volume deposited does not bias the method. The analysis of variance clearly demonstrated this hypothesis, since no significant difference in terms of Pb atomic absorption for the different volumes deposited was observed ($F_{value} = 0.05$, $F_{critical} = 2.47$). Moreover, the relationship between the absorbance and the Pb concentration is linear, and Pearson's coefficient of correlation values of 0.99 or higher were found.

It can be thus concluded that the amount of blood retained per surface area of FP is essentially constant and the amount of Pb deposited per disc depends (linearly) only on the actual Pb concentration in blood samples, which represents the most favourable situation and simplifies the development of a quantitative procedure.

3.2.2 Reproducibility of blood retention per disc. Investigation of possible chromatographic effects. In spite of the promising conclusion obtained in the previous section, there is another potential drawback of the FP-Pb methodology, namely the possible occurrence of chromatographic effects, which could result in a dependence of the amount of Pb upon the position from which the disc is punched out. Again, relatively contradictory results have been reported in the literature, after the monitoring of inner and outer portions of blood spots. El-Hajjar *et al.* indicate that no significant difference in terms of Pb concentration was observed,

Table 2 Evaluation of the effect of the total amount of blood deposited onto the filter paper. (A) Effect on the weight of the 3.2 mm Ø discs punched from the FP. (B) Effect on the Pb atomic absorbance obtained by direct atomization of the 3.2 mm Ø discs. For every result, 7 replicate discs were weighed and subsequently analyzed by SS-GFAAS. The integrated absorbance values were previously blank corrected for a more immediate appreciation of the degree of linearity achieved. Uncertainties are provided as standard deviation values

	Volume of blood deposited onto the FP			
Sample/Pb content	0 μL	50 μL	75 μL	100 μL
A	Weight/mg			
Blood 1/10 μg Pb L^{-1}	1.502 ± 0.053	2.377 ± 0.060	2.320 ± 0.091	2.487 ± 0.123
Blood 2/32 μg Pb L^{-1}	1.512 ± 0.053	2.387 ± 0.143	2.328 ± 0.061	2.300 ± 0.115
Blood 3/70 μg Pb L^{-1}	1.494 ± 0.085	2.374 ± 0.120	2.369 ± 0.073	2.426 ± 0.108
Blood 4/107 μg Pb L^{-1}	1.506 ± 0.076	2.359 ± 0.097	2.332 ± 0.065	2.312 ± 0.097
Blood 5/145 μg Pb L^{-1}	1.522 ± 0.075	2.411 ± 0.121	2.306 ± 0.092	2.327 ± 0.130
B	Integrated absorbance/s			
Blood 1/10 μg Pb L^{-1}		0.013 ± 0.007	0.011 ± 0.006	0.009 ± 0.002
Blood 2/32 μg Pb L^{-1}		0.032 ± 0.004	0.029 ± 0.010	0.029 ± 0.010
Blood 3/70 μg Pb L^{-1}		0.080 ± 0.021	0.071 ± 0.022	0.083 ± 0.013
Blood 4/107 μg Pb L^{-1}		0.095 ± 0.015	0.107 ± 0.022	0.109 ± 0.008
Blood 5/145 μg Pb L^{-1}		0.148 ± 0.020	0.143 ± 0.020	0.146 ± 0.019

providing the edge of the spot (a darker ring that always surrounds the spots, as can be seen in Fig. 5) was excluded from the comparison.[46] The possible influence of this edge is of little practical relevance for the procedure investigated in the present work, since it can hardly be sampled owing to the clear risk of taking a portion of disc containing no blood. On the other hand, Mei *et al.* stated that inner punches retained a blood volume higher than outer punches, although the differences accounted for less than 2% (a value too low to seriously affect the applicability of the method).[35] No attempt to evaluate the incidence of this parameter on the actual retention of Pb was carried out in that work, since it was not devoted to this analyte in particular.

Therefore, in the present work, a study was carried out to further clarify this issue. Two separate 200 μL blood spots were prepared using the same blood sample. This volume produces a spot large enough so it can be divided into 3 different zones from which several discs could be punched (see Fig. 5B). Also, blanks from outer positions were taken in order to discard the eventual migration of Pb to areas located even further away.

The results obtained after direct analysis of the discs by SS-GFAAS are shown in Table 3. No difference could be appreciated for the Pb atomic absorption values, which indicates a fairly homogenous distribution. The analysis of variance confirmed that the possible differences are far from being statistically significant (F_{value} = 0.13, $F_{critical}$ = 3.23). With regard to the blank, no Pb signal was obtained (blank discs provided values that were very similar to those obtained upon atomization of chemical modifier solutions), indicating that all Pb is retained in the dried blood area. In conclusion, it seems that the discs can practically be punched from any part inside the blood spot.

Table 3 Evaluation of the possible effect of the position from which the 3.2 mm Ø discs are punched when using FP-SS-GFAAS. The three different zones sampled are shown in Fig. 5B. 14 replicates, obtained from 2 different blood spots prepared with the same blood sample, were carried out for each zone. The integrated absorbance values were previously blank corrected. Uncertainties are provided as standard deviation values

Sample	Inner zone	Central zone	Outer zone
	Integrated absorbance/s		
CRM ERM®-CE194	0.116 ± 0.021	0.114 ± 0.014	0.116 ± 0.011

3.3 Calibration

As demonstrated over the years in several works,[27,28] when using SS-GFAAS it is often feasible to obtain a good degree of accuracy by using simple calibration procedures with aqueous standard solutions. Certainly, this is a significant advantage when compared with other solid sampling techniques that rely exclusively on the use of solid standards for calibration, since it is often not feasible to obtain perfectly matrix-matched and sufficiently homogeneous materials to be used as such. However, a very special case is investigated in the present work, in which a liquid sample (of unknown volume, in practice, for real samples) is transformed into a solid sample by depositing it onto a filter. For this situation, using aqueous standards for calibration does not seem too appealing for the following reasons:

(a) It is not straightforward to relate the absolute amount of Pb present in a 3.2 mm Ø disc with the concentration of Pb in the original blood sample, since for that calculation it would be necessary to know the exact volume of fresh blood originally deposited onto this disc. It is possible to make an estimation of this volume by depositing a known volume of blood onto the FP, measuring the diameter of the resulting blood dried spot and proportionally relating its area (assuming that the spot is perfectly circular) with the area of the disc. By means of this procedure, it was calculated that in every 3.2 mm Ø disc, approximately 3 μL of fresh blood are deposited, which is in good agreement with values reported elsewhere.[17,35,36] However, this is only a gross estimation, not very suitable for quantification.

(b) Moreover, according to the results obtained in previous experiments (see Fig. 3), the signal for similar amounts of Pb atomized from blood-embedded FP discs is significantly lower than that obtained from aqueous standards, indicating that the Pb signal is not free from matrix effects. Similar matrix effects have been reported in the determination of Pb in liquid whole blood when the sample is not sufficiently diluted.[37] This

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2007

behaviour was further assessed by the deposition of a very small amount of blood (1 μL) of known concentration onto the filter paper, in such a way that the whole blood spot was included in one of the 3.2 mm Ø discs introduced in the furnace, so the amount of Pb monitored was exactly known. The signal obtained for these discs was approximately 50% of that obtained for a similar amount of Pb atomized from an aqueous solution.

Even though it might be possible to further attempt to eliminate these matrix effects (by additional optimizations of the temperature program and testing of different chemical modifiers), and try to estimate the volume of fresh blood corresponding to every disc with more precision, in this case it just seems more simple to calibrate using matrix-matched blood standards, deposited onto FP and treated in the same way as the samples. This procedure presents the following important advantages: (i) the detected matrix effects should not bias the results; (ii) no transformation of the results is needed as the Pb concentration in blood is directly obtained by interpolation from the calibration curve; (iii) it is straightforward for a clinical laboratory to prepare homogeneous blood standards of the concentration demanded, by spiking real samples (with no significant amount of Pb detected in previous analysis) with a known amount of analyte. The use of samples of known concentration as standards (CRMs or samples previously analyzed) is also possible. Therefore, this procedure was tested and the blood standards prepared, as described in Section 2.2.3.

Several standards were prepared with lead concentrations ranging from 44 to 837 μg L^{-1}, not only for calibration purposes, but also for linearity studies. Using stop flow conditions, the method showed a very good linearity ($r^2 \geq 0.995$) up to 450 μg L^{-1}, which is usually sufficient for the expected range of concentrations of Pb in human blood. However, this range could be further expanded by maintaining the Ar flow during the atomization. For instance, the use of minimum Ar flow (0.1 L min^{-1}) represents a 3-fold loss in sensitivity and permits expanding the range at least up to 837 μg L^{-1}. Higher concentrations were not tested, as they are certainly not expected in living human beings.

In order to further check the robustness of the calibration procedure, three different sets of blood samples were spiked with the same Pb concentrations and monitored by FP-SS-GFAAS on different days. The slope obtained in every case was essentially the same, ranging from 0.00092 to 0.00101 s L μg^{-1}.

3.4 Results of the FP-SS-GFAAS procedure for Pb monitoring in blood

3.4.1 Analysis of a CRM. Once the different relevant parameters were optimized, a CRM (ERM®-CE194 bovine blood) was analyzed following the procedure described in Section 2.3. This sample was selected since its Pb content (126 ± 4 μg L^{-1}) is close to the level of concern (100 μg L^{-1}) established by CDCP.[9] Thirteen independent determinations (analysis of 5 replicate discs per determination) were carried out, and the results finally obtained are shown in Table 4. The values obtained confirm that accurate results can be achieved with this procedure, while the precision (6.2% RSD) is more than sufficient for the application. As a reference, it can be mentioned that the CLIA (Clinical Laboratory Improvement Amendments) criteria for this range of concentration considers as much as a 40 μg Pb L^{-1} deviation as acceptable.[47] The methodology proposed certainly seems capable of complying with more stringent requirements.

Table 4 Results obtained after FP-SS-GFAAS analysis of one blood reference material following the procedure described in Section 2.3. Every determination consisted of the measurement of 5 replicate dried blood spot discs

Sample		FP-SS-GFAAS	Certified value
CRM ERM®-CE194	Number of determinations	13	
	Result ± 95% C.I. (μg Pb L^{-1})	131 ± 5	126 ± 4
	RSD%	6.2	

3.4.2 Analysis of real samples. Correlation with venous blood analysis by liquid-GFAAS. In order to further prove the applicability of this procedure, real samples were also analyzed. Blood from a number of patients was obtained, both by venipuncture and by finger stick, in order to truly evaluate the whole FP-SS-GFAAS methodology and compare its performance with the widely established venous blood analysis by dilution-GFAAS.[33,34] In this study, it was intended to cover the widest possible range of lead concentrations. Taking into consideration that, fortunately, lead contamination seldom occurs in our location, it was only possible to select blood samples covering the range from 24 to 160 μg Pb L^{-1}. As most samples presented values lower than 30 μg L^{-1}, eighteen blood samples distributed more or less regularly throughout the range of concentrations were finally selected, as it is well known that extreme values could bias the study to better correlation.

The results of this comparison are plotted in Fig. 6. The good fit, expressed by Pearson's correlation coefficient, the low value for the intercept and the closeness of the slope to unity demonstrate that a very good agreement between both methods was achieved. However, in the clinical community, the most accepted way to compare the performance of two different methods is to use a non-parametric linear regression procedure called Passing–Bablok regression (PBR) analysis.[48] This procedure, like all non-parametric approaches, is less sensitive to outliers. Moreover, instead of using the traditional Pearson's coefficient of correlation, it is recommended to use Lin's concordance correlation coefficient, which provides a more robust estimation of the agreement between methods by actually monitoring the degree of deviation of the results from the expected 45° line through the origin.[49] Therefore, the same set of results was also analyzed by PBR. The regression obtained was: FP-SS-GFAAS = 0.617 + 1.003 × venous blood-GFAAS. The 95% confidence intervals for the intercept (−7.667 to 5.238) and the slope (0.907 to 1.104) include the values 0 and 1, respectively, proving that no constant or proportional bias was observed when comparing both methods. A value for Lin's concordance correlation coefficient of 0.99 was calculated, further confirming the excellent

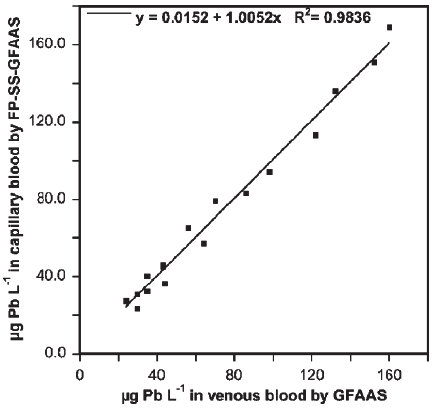


Fig. 6 Linear least squares regression analysis of blood lead contents obtained for paired samples from 18 patients using two methodologies: FP-SS-GFAAS (y-axis) vs. analysis of venous samples by solution GFAAS (x-axis). The analytical procedures are described in detail in Sections 2.3. and 2.4, respectively.

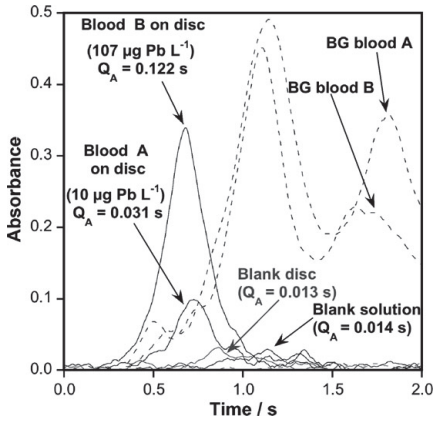


Fig. 7 Comparison of the signal profiles obtained for two different samples (A and B) and for two different kinds of blanks (blank FP disc plus modifier, and blank solution containing only the chemical modifier) using FP-SS-GFAAS.

agreement achieved. It can be relevant to mention that, in previous works comparing analysis of capillary blood in FP vs. analysis of venous blood, the same degree of agreement has not always been reported. In fact, it has been pointed out that in most cases a significantly lower slope (from 0.8 to 0.9) has been obtained,[16,21,25] suggesting the incomplete recovery of Pb from the FP during the extraction procedure. The direct solid sampling method proposed in the present work avoids any sample treatment, which seems to be a significant advantage in this case, as it could possibly lead to more reliable results.

On the other hand, it may be also worthwhile to comment on the quality of the blanks obtained. Generally speaking, the potential of the FP-Pb methodology for giving rise to false positives is a subject of controversy in the clinical literature. This fact is often attributed to specimen contamination during sampling collection from lead present on the skin surface.[14,50] Of course, suitable cleansing before sampling should solve this problem, as demonstrated in several works.[10,16] However, the possible contamination of the filter paper with Pb has also been mentioned as the reason for a positive bias,[14,46] although results reported in other works disagree.[15,21] Obviously, since in these works sample digestion or analyte extraction are needed, it maybe difficult to separately ascertain the level of contamination of the FP and of the different reagents used, which can be the cause for these discrepancies. In the current work, more than 100 different filter papers were subjected to direct analysis without detecting any trace of Pb, supporting the fact that the paper used can be considered as Pb-free.[15,21] Fig. 7 shows a typical signal profile obtained for a blank (FP disc plus modifier solution). As can be seen, it is not significantly different from the one obtained just for the modifier solution and does not show indications of any atomic absorption signal. The signal for a 10 mg Pb L^{-1} sample can be easily differentiated from it. A detection limit of 2.5 mg Pb L^{-1} was calculated for the method used in this work. This detection limit is lower than those reported in works using the standard method (GFAAS analysis of venous blood), which typically ranges between 4 and 13 mg L^{-1},[17,34,37,43,44,51] and is clearly fit for purpose since Pb values at this concentration level are hardly relevant from a toxicological point of view.

Overall, it can be concluded that the combination of a careful sampling procedure with the use of a sensitive solid sampling technique that allows direct analysis of the FP-specimens with minimum manipulations permits the reliable determination of Pb in blood, providing results in very good agreement with those obtained by the standard venous blood procedure.

4. Conclusions

In this work, the applicability of solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for the direct determination of Pb in dried blood-spot filter paper specimens has been evaluated. The results obtained suggest that this methodology can provide results for the Pb levels in blood that are in very good agreement with those obtained by venipuncture and conventional analysis of the diluted blood. SS-GFAAS seems to well suit analysis of this kind of sample, providing reliable and fast results, even at the low mg Pb L^{-1} level, with sufficient precision, while preventing contamination issues.

Thus, the use of the FP-SS-GFAAS procedure for analysis of capillary blood seems very appropriate for establishing large scale Pb screening programs, taking advantage of the potential of the filter paper approach for simple and mobile blood collection and of the possibilities of SS-GFAAS for fast analysis of the samples subsequently obtained.

Acknowledgements

The authors would like to thank the Spanish Ministry of Education and Science (Project CTQ2006-03649/BQU), the

 This journal is © The Royal Society of Chemistry 2007

University of Zaragoza (Ibercaja Project 230-121) and the Diputación General de Aragón (DGA) for financial support.

References

1 American Academy of Pediatrics, Committee on Environmental Health, *Pediatrics*, 2005, **116**, 1036–1046.
2 C. D. Toscano and T. R. Guilarte, *Brain Res. Rev.*, 2005, **49**, 529–554.
3 T. I. Lidsky and J. S. Schneider, *Brain*, 2003, **126**, 5–19.
4 T. I. Lidsky and J. S. Schneider, *Environ. Res.*, 2006, **100**, 284–293.
5 K. N. Dietrich, M. D. Ris, P. A. Succop, O. G. Berger and R. L. Bornschein, *Neurotoxicol. Teratol.*, 2001, **23**, 511–518.
6 R. L. Canfield, C. R. Henderson, Jr, D. A. Cory-Slechta, C. Cox, T. A. Jusko and B. P. Lanphear, *N. Engl. J. Med.*, 2003, **348**, 1517–1526.
7 S. J. Pocock, M. Smith and P. Baghurst, *Br. Med. J.*, 1994, **309**, 1189–1197.
8 J. Schwartz and D. Otto, *Arch. Environ. Health.*, 1991, **46**, 300–305.
9 Centers for Disease Control, Preventing Lead Poisoning in Young Children: A Statement by the Centers for Disease Control, US Dept. of Health and Human Services, Public Health Service, Atlanta, GA, 1991.
10 X. M. Shen, Y. W. Zhang, S. H. Wu, C. H. Yan, J. M. Ying and R. Q. Li, *Clin. Chim. Acta*, 2003, **328**, 99–104.
11 G. Lalor, R. Rattray, M. Vutchkov, B. Campbell and K. Lewis-Bell, *Sci. Total Environ.*, 2001, **269**, 171–181.
12 S. P. Parker and W. K. Cubitt, *J. Clin. Pathol.*, 1999, **52**, 633–639.
13 A. A. Cernik and M. H. P. Sayers, *Br. J. Ind. Med.*, 1971, **28**, 392–398.
14 T. P. Moyer, D. N. Nixon and K. O. Ash, *Clin. Chem.*, 1999, **45**, 2055–2056.
15 K. Verebey, *Clin. Chem.*, 2000, **46**, 1024–1026.
16 T. G. Holtrop, H. Y. Yee, P. M. Simpson and R. E. Kauffman, *Arch. Pediatr. Adolesc. Med.*, 1998, **152**, 455–458.
17 S. T. Wang and H. P. Demshar, *Analyst*, 1992, **117**, 959–961.
18 Y. W. Wong, E. R. Ashwood, W. Gordon and K. O. Ash, *Clin. Chem.*, 1995, **41**, S145.
19 H. Y. Yee and T. G. Holtrop, *J. Anal. Toxicol.*, 1997, **21**, 142–148.
20 J. Crick and A. R. Flegal, *Clin. Chem.*, 1992, **38**, 600–601.
21 T. P. Moyer, D. E. Nixon and O. K. Ash, *Clin. Chem.*, 2000, **46**, 1026–1028.
22 M. T. Di Martino, A. Michniewicz, M. Martucci and G. Parlato, *Clin. Chim. Acta*, 2004, **350**, 143–150.
23 H. T. Delves, *Analyst*, 1970, **95**, 431–438.
24 K. Verebey, J. F. Rosen, D. J. Schoenfeld, D. Carriero, Y. M. Eng, J. Deutsch, S. Reimer and J. Hogan, *Clin. Chem.*, 1995, **41**, 469–470.
25 N. V. Stanton, J. M. Maney and R. Jones, *Clin. Chem.*, 1999, **45**, 2229–2235.
26 U. Kurfüst, *Solid Sample Analysis*, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, 1998.
27 M. A. Belarra, M. Resano, F. Vanhaecke and L. Moens, *Trends Anal. Chem.*, 2002, **21**, 828–839.
28 M. G. R. Vale, N. Oleszczuk and W. N. L. dos Santos, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 2006, **41**, 377–400.
29 D. L. Gallindo Borges, A. Furtado da Silva, B. Welz, A. J. Curtius and U. Heitmann, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 763–769.
30 K. C. Friese and V. Krivan, *Spectrochim. Acta, Part B*, 1998, **53**, 1069–1078.
31 W. H. Hannon, C. M. Baily, L. E. Bartoshesky, B. Davin, G. L. Hoffman, P. P. King, S. S. Neier, J. A. Peter and B. L. Therrell, Blood Collection on Filter Paper for Newborn Screening Programs; Approved Standard—Fourth Edition, NCCLS document LA4-A4 (ISBN 1-56238-503-8), NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087–1898 USA, 2003.
32 M. A. Belarra, M. Resano and J. R. Castillo, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1999, **14**, 547–552.
33 P. J. Parsons, J. J. Chisolm, H. T. Delves, R. Griffin, E. W. Gunter, W. Slavin, N. V. Stanton and R. Vocke, Analytical Procedures for the Determination of Lead in Blood and Urine; Approved Guideline, NCCLS document C40-A (ISBN 1-56238-437-6), NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087–1898 USA, 2001.
34 P. J. Parsons and W. Slavin, *Spectrochim. Acta, Part B*, 1993, **48**, 925–939.
35 J. V. Mei, J. R. Alexander, B. W. Adam and W. H. Hannon, *J. Nutr.*, 2001, **131**, 1631S–1636S.
36 B. W. Adam, J. R. Alexander, S. J. Smith, D. H. Chace, J. G. Loeber, L. H. Elvers and W. H. Hannon, *Clin. Chem.*, 2000, **46**, 126–128.
37 N. Campillo, P. Viñas, I. López-Garcia and M. Hernández-Córdoba, *Anal. Chim. Acta*, 1999, **390**, 207–215.
38 D. I. Bannon, C. Murashchik, C. R. Zapf, M. R. Farfel and J. J. Chisolm, Jr, *Clin. Chem.*, 1994, **40**, 1730–1734.
39 P. J. Parsons, C. Geraghty and M. F. Verostek, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2001, **56**, 1593–1604.
40 A. B. Volynsky, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2004, **59**, 1799–1821.
41 M. A. Belarra, M. Resano, S. Rodríguez, J. Urchaga and J. R. Castillo, *Spectrochim. Acta, Part B*, 1999, **54**, 787–795.
42 M. Resano, M. Aramendía, A. B. Volynsky and M. A. Belarra, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2004, **59**, 523–531.
43 I. L. Shuttler and H. T. Delves, *Analyst*, 1986, **111**, 651–656.
44 H. Qiao, P. J. Parsons and W. Slavin, *Clin. Chem.*, 1995, **41**, 1451–1454.
45 M. A. Belarra, M. Resano and J. R. Castillo, *J. Anal. At. Spectrom.*, 1998, **13**, 489–494.
46 D. F. El-Hajjar, K. H. Swanson, J. K. Landmark and D. F. Stickle, *Clin. Chim. Acta*, 2007, **377**, 179–184.
47 P. J. Parsons, A. A. Reilly, D. Esernio-Jenssen, L. N. Werk, H. C. Mofenson, N. V. Stanton and T. D. Matte, *Clin. Chem.*, 2001, **47**, 322–330.
48 H. Passing and W. Bablok, *J. Clin. Chem. Clin. Biochem.*, 1983, **21**, 709–720.
49 L. I. Lin, *Biometrics*, 1989, **45**, 255–268.
50 P. J. Parsons, A. J. Reilly and D. Esernio-Jenssen, *Clin. Chem.*, 1997, **43**, 302–311.
51 P. C. D'Haese, L. V. Lamberts, L. Liang, F. L. van de Vyver and M. E. De Broe, *Clin. Chem.*, 1991, **37**, 1583–1588.

Spectrochimica Acta Part B 66 (2011) 321–328

Contents lists available at ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/sab

On the possibilities of high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple atomic lines

M. Resano [a,*], L. Rello [a,b], M. Flórez [a], M.A. Belarra [a]

[a] Department of Analytical Chemistry, University of Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, Spain
[b] Department of Clinical Biochemistry, "Miguel Servet" Universitary Hospital, Paseo Isabel La Católica 1–3, 50009 Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 29 December 2010
Accepted 24 March 2011
Available online 2 April 2011

Keywords:
Solid sampling
High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry
Multi-element analysis
Internal standardization
Monitoring of multiplets

ABSTRACT

This paper explores the potential of commercially available high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry instrumentation for the simultaneous or sequential monitoring of various atomic lines, in an attempt to highlight the analytical advantages that can be derived from this strategy. In particular, it is demonstrated how i) the monitoring of multiplets may allow for the simple expansion of the linear range, as shown for the measurement of Ni using the triplet located in the vicinity of 234.6 nm; ii) the use of a suitable internal standard may permit improving the precision and help in correcting for matrix-effects, as proved for the monitoring of Ni in different biological samples; iii) direct and multi-element analysis of solid samples may be feasible on some occasions, either by monitoring various atomic lines that are sufficiently close (truly simultaneous monitoring, as demonstrated in the determination of Co, Fe and Ni in NIST 1566a Oyster tissue) or, alternatively, by opting for a selective and sequential atomization of the elements of interest during every single replicate. Determination of Cd and Ni in BCR 679 White cabbage is attempted using both approaches, which permits confirming that both methods can offer very similar and satisfactory results. However, it is important to stress that the second approach provides more flexibility, since analysis is no longer limited to those elements that show very close atomic lines (closer than 0.3 nm in the ultraviolet region) with a sensitivity ratio similar to the concentration ratio of the analytes in the samples investigated.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

The recent commercial release of high-resolution continuum source atomic absorption spectrometers (HR CS AAS) represents a revolution in this field, in particular when aiming at the direct analysis of complex samples. This type of instrumentation, based on the prototype developed by Becker-Ross and co-workers [1,2], brings about very significant improvements in comparison with traditional line source devices. The main advantages of HR CS AAS can be summarized as follows [3]:

(a) Improved signal stability. The array detector used in the device commercially available permits the simultaneous monitoring of two hundred "wavelength sectors" (pixels), enabling efficient correction for many unwanted spectroscopical events (e.g., lamp flicker noise, temporal changes in the transmittance of the gas phase, etc.). This aspect, in combination with the higher radiation intensity of the Xe lamp compared with that of traditional line sources, makes it feasible to obtain better-defined signals at lower analyte levels, and results in better limits of detections (a factor of 3 to 5).
(b) Superior background correction potential. This technique allows monitoring the spectral neighborhood of the analyte lines, thus permitting to detect potential interferences. In the case that these interferences cannot be resolved in time (by optimization of the temperature program combined with the use of chemical modifiers), the technique still offers a considerably superior approach for the mathematical correction of complex, high and even rapidly changing backgrounds, since they are monitored simultaneously with the atomic absorption lines [1,4–7].
(c) Expanded linear range. It is possible to decrease the sensitivity and therefore expand the working range by measuring the absorbance at the wings of absorption lines [8,9].
(d) Potential to monitor molecular lines. This fact opens the doors to determine relatively low levels of non-metals, such as Cl, F, P or S, for which using narrow molecular absorption "lines" may be an appealing alternative since the most sensitive atomic lines for these elements are situated in the far UV region, which is not accessible for line source AAS instrumentation [10,11].

* Corresponding author. Tel.: +34 976761634; fax: +34 976761290.
E-mail address: mresano@unizar.es (M. Resano).

0584-8547/$ – see front matter © 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.
doi:10.1016/j.sab.2011.03.008

(e) Only one lamp source is needed. Self-evidently, this is an important practical advantage, as traditional line source AAS required the acquisition of many lamps, some of which were often seldom used.

It is necessary to say that there are still some traditional disadvantages of the technique that persists (e.g., difficulties in achieving good sensitivity for refractory analytes and memory effects when using a graphite furnace atomizer), but, overall, the development of HR CS instrumentation represents a significant step forward for AAS. However, despite of these important advantages, there is one aspect notoriously lacking in the previous discussion. That is the potential for multi-element analysis. Obviously, this aspect can be considered as one of the driving forces behind the development of continuum source-based AAS. However, despite of the promising characteristics of the HR CS AAS technique, it seems that the currently available detectors do not permit to easily implement this important characteristic in an AAS instrument, as discussed in various reviews [12–15]. The instrumentation currently available features a detector with 588 pixels, but only 200 of those pixels are used for analytical purposes (the rest are used for internal corrections). This instrument provides exceptional resolution, and every one of those pixels monitors a range of only 1 to 2 pm, but that also means that such instrument only allows for the simultaneous monitoring of much less than 1 nm of spectrum (0.2–0.3 nm in the UV region and up to 0.5 nm in the visible region). This bandwidth is very narrow, which seriously limits the potential for simultaneous multi-elemental analysis with graphite furnace AAS (GFAAS). It has to be mentioned that this limitation is not very relevant for flame AAS, since multi-elemental analysis based on a fast sequential operation mode can be more easily performed with this technique.

Despite this important limitation, Welz and co-workers have succeeded in developing some applications in which two elements were determined simultaneously using GFAAS [16–20], which represents an obvious improvement in comparison with typical line source AAS possibilities. Moreover, in addition to multi-element analysis, there are other aspects of analytical interests that the use of HR CS AAS makes possible, such as the use of an internal standard or the individual monitoring of all the lines available in multiplets that, to the best of the authors' knowledge, have not been systematically investigated.

This works aims at evaluating the performance of commercially available HR CS AAS instrumentation for the simultaneous or sequential monitoring of multiple lines, in an attempt to obtain analytical improvements such as an extended linear range, a mean to correct for matrix-effects, to improve precision or to obtain multi-element information. The work will emphasize these aspects in the context of direct analysis of solid samples and complex materials and will focus on GFAAS, owing to its superior potential to perform in such a context [21–24].

2. Experimental

2.1. Apparatus

All the experiments in this work were carried out using a HR CS AAS, ContrAA 700, commercially available from Analytik Jena AG (Jena, Germany) and equipped with both graphite furnace and flame atomizers. The optical system comprises a xenon short-arc lamp (GLE, Berlin, Germany) operating in "hot-spot" mode as the radiation source, a high-resolution double echelle monochromator (DEMON) and a linear CCD array detector with 588 pixels, 200 of which are used for analytical purposes (monitoring of the analytical signal and BG correction), while the rest are used for internal functions, such as correcting for fluctuations in the lamp intensity. More details on this type of instrumentation can be found elsewhere [2].

The HR CS AAS instrument is equipped with a transversely heated graphite tube atomizer and both solid sampling and liquid sampling autosamplers. The solid sampling device (SSA 600) incorporates a microbalance with a readability of 1 μg [24]. Pyrolytic graphite tubes were used in all experiments. Solid samples were introduced using solid sampling graphite platforms.

2.2. Standard solutions and reagents

Purified water was obtained from a Milli-Q system (Millipore, Billerica, USA). Ag, Cd, Co, Ni, Fe, and Pd solutions were prepared daily by diluting a commercially available 1 g L^{-1} standards (Merck, Darmstadt, Germany).

2.3. Samples

Two biological reference materials produced by NIST (National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, USA) and BCR (Community Bureau of Reference, Geel, Belgium) were analyzed in this work. The materials investigated were: SRM 1566a Oyster tissue from NIST and CRM 679 White cabbage from BCR. Both were available as powders.

Blood and urine standards of known Ni contents were prepared by addition of suitable quantities of Ni solution to Ni-free (meaning that the Ni level was below the LOD of the standard GFAAS method) venous blood samples and urine samples.

2.4. Procedure for solid sampling HR CS GFAAS analysis

Samples were directly analyzed without any prior preparation step. The solid sampling device used allows for automatic weighing and transporting of the samples into the furnace [25]. The empty platform was first transported to the microbalance using a pair of tweezers. After taring, an appropriate amount of sample was placed on the platform and weighed. The corresponding amount of chemical modifier, if needed, was added afterwards. Finally, the platform was transferred into the graphite furnace and subsequently subjected to the temperature program. All these operations were fully controlled from the computer, except for the deposition of the sample and the modifier solutions onto the platform, which was carried out manually.

The operating conditions are summarized in the Tables shown in Section 3.3. Integrated absorbance was selected as the measurement mode in all cases. For every line evaluated, the values obtained for three detector pixels (the central pixel plus the adjacent ones, CP ± 1), were summed.

The calibration was performed using 10 μL of an aqueous solution of the appropriate concentration added with a micropipette, together with the modifier solutions if needed, onto the sampling platform. Five replicate measurements (representing approximately 15–20 min of work) were carried out for each determination and the median was taken as the representative value, in order to minimize the possible influence of outliers [26].

3. Results and discussion

3.1. Benefits derived from the monitoring of multiplets

One of the main obvious advantages of HR CS AAS is that all absorption lines of all elements that fall within the spectral range of the spectrometer (from 190 to 900 nm) are accessible. Moreover, the radiation intensity of the continuum source used in this device is, on average, about two orders of magnitude higher than that of the narrow emission lines of a hollow cathode lamp over that spectral range. [27]. In the words of Welz et al., "this means that there are no more "weak lines"; that is, lines with low emission intensity and hence a poor signal to noise ratio [12]." Thus, the situation for using

less sensitive lines has improved considerably. This aspect is important to develop direct solid sampling applications, because it is not simple to dilute the samples and, quite often, if the analyte is present in the sample at relatively high levels, the use of alternative lines becomes a need [21,22,24,28]. Moreover, this aspect may be even further improved if the transition selected shows a multiplet.

This fact represents a significant difference compared with the situation typically found when using line sources. In that case, whenever a multiplet was monitored, actually the combined absorption of all the multiplet lines was typically measured (unless the difference between the lines was high enough such that the resolution of the monochromator allowed for the selection of only one of them), which often translated into poor linearity.

The use of HR CS AAS has reverted this situation, making it more appealing to monitor multiplets. With this instrumentation, it is now possible to get all the information on every line of the multiplet separately. If the sensitivities of these lines are similar, it has already been demonstrated by Heitmann et al. (who monitored the Mn —279.482/279.827/280.108 nm- and V —318.341/318.397/318.538 nm- triplets) that using all the lines and summing their signals improves a bit (less than a factor of two for those cases) the limit of detection (LOD) [8]. This effect can be increased even further when monitoring molecular "lines" (corresponding with the rotational hyperfine structure of molecular electronic transitions), as in that case the number of lines with similar sensitivity can be much higher (e.g., up to 10 for the monitoring of PO lines in the vicinity of 213.618 nm [29]), making this aspect more appealing (LOD improved a factor of 3 in that situation). In any case, using all the information of these lines enhances the reliability of the analytical results, as it serves to detect potential interferences (e.g., if different lines provide significantly different analytical results).

However, another advantageous situation occurs when the sensitivity of the lines forming the multiplet is significantly different. In this case, it does not make much sense to combine the signals obtained for all the lines, since the addition of the least sensitive lines would improve the overall analytical signal only very moderately, causing at the same time an increase in the noise level and, thus, degrading the final LOD. Instead, this situation represents a very simple way to expand the linear range, because the linearity of every one of these lines should be very different. Fig. 1 shows an example of this situation. In this case, a Ni triplet (234.554/234.663/234.751 nm) is being measured. Ni is one of the elements that show more atomic lines, including various multiplets [12].

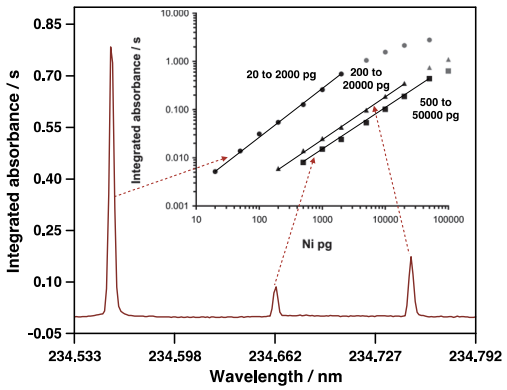


Fig. 1. Wavelength-resolved time-integrated absorbance spectrum showing the Ni triplet located in the vicinity of 234.6 nm, as obtained after HR CS GFAAS measurement of an aqueous solution containing 10 ng of Ni. The linear range of every line of the triplet is also shown.

Table 1
Analytical performance of the lines that compose the Ni triplet found in the vicinity of 234.6 nm.

Wavelength/nm	Characteristic mass/pg	LOD/pg	Linear range[a]/pg	R^2
234.554	16	11	Up to 2000	0.998
234.663	260	210	Up to 50,000	0.999
234.751	140	160	Up to 20,000	0.999

[a] The upper limit of the linear range was calculated by applying the Dixon-Q test to the residuals of the calibration points in order to confirm if a suspected value was significantly different at the 95% confidence level.

As can be seen in Table 1, these lines show very different sensitivity. The slope of the most sensitive line of the triplet (234.554 nm) is approximately thirty times higher than the slope of the least sensitive one (234.663 nm). In fact, the 234.554 nm line is only a factor of three less sensitive than Ni main line (232.003 nm), which makes the use of this triplet useful for trace analysis. Fig. 1 shows the linear ranges of every one of these lines, which are very wide for AAS (two orders of magnitude per line). Moreover, since all these lines are always simultaneously measured with the HR CS AAS instrument, depending of the analyte concentration of every sample, the analyst can use the most adequate of these lines in every case, therefore covering in practice a range between 20 and 50,000 pg, without the need to modify any experimental conditions and remeasure any sample. This aspect is very important in the context of solid sampling analysis, and even more important if the samples that are being investigated can only be measured once (e.g., direct analysis of individual invertebrates, as described elsewhere [9]).

There are many other elements that show multiplets that can also be used to expand the linearity in this simple and straightforward way. It is necessary be cautious, however, when dealing with lines that are too close (e.g., less than 30 pm distance), as it has to be mentioned that the peak width of the atomic lines (which is typically around 10 pm) tend to increase with an increasing concentration of analyte, such that eventually both lines may overlap, which would affect very significantly the analytical response of the least sensitive line.

3.2. Use of an internal standard

One of the best-known strategies for the correction of possible variations occurring during a series of measurements is the use of an internal standard. This approach, widely used in inductively coupled plasma-based methods, for instance, is not typically used in the case of atomic absorption, mostly owing to the limited potential for multi-element monitoring that characterizes this technique when a line source is used.

A few papers have investigated the benefits of using an internal standard with flame AAS, even using a HR CS AAS device [30], by means of a fast sequential mode [30–33]. However, the best performance for an internal standard can only be achieved when the internal standard and the analyte are truly simultaneously monitored. This aspect has been demonstrated for GFAAS analysis in a number of works using the simultaneous line-source spectrometer SIMAA 6000 [34–39], which was designed to combine and detect the radiation originating from up to four hollow cathode lamps, such that several elements could be measured at the same time. This instrument is no longer commercially available and shows many differences with HR CS GFAAS instrumentation, such that it seems relevant to investigate the performance of the latter instrumentation in detail.

The first obvious difference is that, for truly simultaneous monitoring using HR CS AAS, the line of the analyte and that of the internal standard need to be within the narrow spectral bandwidth that is possible to visualize with such an instrument (0.2–0.3 nm in the UV region, as discussed in the introduction). Even though this is a clear limitation, it is not so severe in this case, because the internal

standard is an element that the analyst can select, and there are a number of elements with hundreds of atomic lines (e.g., Co, Cr, Fe, Ni or Ti) that could be used for the purpose. Moreover, it is always positive to select a line for the internal standard that is close to that of the analyte, because there are some matrix-effects that are wavelength dependent (e.g., scattering of radiation) and that could otherwise affect them in a different way.

Besides that condition, there are a number of additional requirements, the most important being: i) the internal standard should not be present at significant levels in the sample (or, if it is present, its content should be known in advance, and then it would not be necessary to spike the sample with a solution of the internal standard); ii) the ratio between the signals of the internal standard and the analyte should be close to unity; and iii) the physicochemical properties of both the internal standard and the analyte should be as similar as possible, to ensure that they endure exactly the same conditions during the measurements. The latter aspect is particularly important in the case of GFAAS analysis because, if the elements do not show similar volatilities in a graphite furnace, they will be vaporized and atomized at different times, such that the correlation between their respective sources of uncertainties will be poor. This aspect has already been demonstrated in the works referred before by using the SIMAA 6000 instrument [36–38], and the situation found with HR CS GFAAS is no different.

To illustrate this point, Table 2 shows the results obtained for the measurement of fifteen consecutive firings for Ag and Ni using or not using Ni or Co, respectively, as internal standards. In both cases, a line for the internal standard sufficiently close to that of the analyte could be found. Amounts of both the analyte and the internal standard that provide signals sufficiently high (integrated absorbance in the range 0.3–0.5 s) and with a ratio close to unity were chosen, such that optimal precision can, in principle, be obtained. As can be seen, in fact, the precision obtained when using typical working conditions (10 μL for sampling) is fairly good (better than 2% RSD) in the absence of an internal standard. It is obviously difficult to improve such values, and, in fact, the use of an internal standard is (slightly) detrimental when Ni is used as such to monitor Ag. This reflects the point discussed before. Ni and Ag are not vaporized and atomized simultaneously (see Fig. 2A), so the variations occurring during these processes may affect them in a different way. This is clearly indicated by the poor correlation coefficients found for their signals (see Table 2). As a result of this, the final uncertainty of the measurement has now two contributions instead of only one.

The case for Ni and Co is different. These elements behave very similarly in a graphite furnace and their atomization occurs simultaneously (see Fig. 2B), which translates into a very good correlation between the signals for both elements. As a consequence, Co performs very well as internal standard for Ni, helping to correct for measurement drifts and improving the overall precision for Ni monitoring below 1% RSD in optimal conditions, a value uncharacteristically low for GFAAS and, in practice, out of reach without the use of an internal standard.

However, the use of an internal standard can also be beneficial even when the electrothermal behavior of the analyte and of the internal standard are not so similar, if conditions are such that the main source of uncertainty affects both in a similar way. For instance, if owing to low sample availability it is necessary to work with lower volumes (2 μL is the minimal amount that our autosampler can deliver), the variation in the sampling is expected to become the main source of uncertainty, and it should affect both the internal standard and the analyte in the same way, providing they are found in the primary sample solution. This effect is shown in Table 2. As can be seen, when delivering only 2 μL of sample, precision degrades to 7–8%

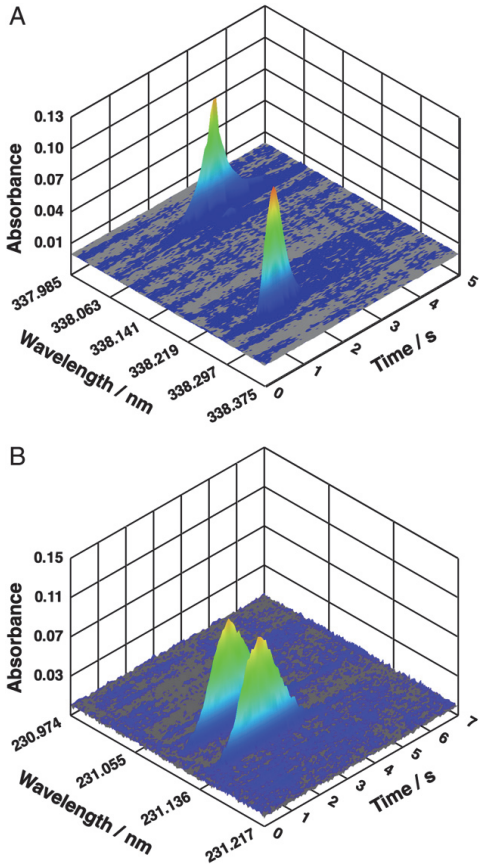


Fig. 2. A) Time- and wavelength-resolved absorbance spectra obtained upon HR CS GFAAS measurement of an aqueous solution containing Ag (400 pg) and Ni (40 ng). The atomic lines of 338.289 nm (Ag) and 338.057 nm (Ni) were selected for the measurements; B) Time- and wavelength-resolved absorbance spectra obtained upon HR CS GFAAS measurement of an aqueous solution containing Ni (1 ng) and Co (400 ng). The atomic lines of 231.096 nm (Ni) and 231.136 nm (Co) were selected for the measurements.

Table 2
Comparison of the precision achieved for the monitoring of aqueous standard solutions by means of HR CS GFAAS, with and without the use of an internal standard (IS). Fifteen consecutive measurements were carried out in each case.

Analyte amount	IS amount	Analyte line/nm	IS line/nm	Volume/μL	%RSD (without IS)	%RSD (with IS)	R value[a]	F value[b]
400 pg Ag	40 ng Ni	338.289	338.057	10	1.7	2.1	0.0885	1.53
400 pg Ag	40 ng Ni	338.289	338.057	2	7.5	3.1	0.9390	5.85
1 ng Ni	400 ng Co	231.096	231.136	10	1.7	0.8	0.9469	4.52
1 ng Ni	400 ng Co	231.096	231.136	2	7.3	3.3	0.9638	4.89

[a] Correlation coefficient between the signal of the analyte and that of the internal standard.
[b] Critical value of the F test = 2.47.

RSD in both cases (the main uncertainty source is the same), and the use of an internal standard is beneficial, significantly (as proved by F test values) improving this value down to 3% RSD. A similar effect can be expected to occur in real-life applications when analyzing viscous samples, such that variations in the sampling efficiency may degrade precision significantly.

But obviously, the main motivation for using an internal standard is correcting for matrix-effects and making it easier to develop calibration approaches when analyzing complex samples, as already described in the literature for the determination of Pb in vinegar [34], Se in sparkling water [35], Cd and Pb in blood [36], Pb in various biological samples [37], As and Se in urine [38] and As, Cu and Pb in sugar-cane [39], using the SIMAA 6000 device in all the cases. The same principle can be applied to HR CS GFAAS, using the same Ni and Co lines already shown in Fig. 2B.

When aiming at analysis of biological samples, matrix-effects are not infrequent. A comparison of calibration curves obtained for Ni when measuring aqueous standards, urine samples (diluted only 1:1) and blood samples (diluted 1:3) was carried out, and differences in the analytical responses were appreciated. In particular, for blood, the slope was 18% lower than that obtained with aqueous standards. This matrix-effect could be efficiently corrected for when using the signal for Co as internal standard, which permitted obtaining practically identical calibration curves, regardless of the matrix (less than 2% difference in the slopes, see Fig. S-1 – Supplementary data in Appendix A – for more details). Moreover, this situation represents the case described above where matrix-effects and irreproducible sampling degrade the precision. In fact, precision for 15 replicate measurements of urine and blood was characterized by RSD values of 6.8% and 8.4%, respectively, values which could be improved to 1.8% and 2.9% when Co was used as internal standard, owing to the correlation found between Ni and Co signals ($r = 0.961$ and $r = 0.947$, respectively). This aspect is illustrated in Fig. 3, where the individual values for Ni and Co in urine, as well as their respective ratios, are displayed.

Overall, it is these authors' opinion that the use of an internal standard in connection with HR CS AAS instrumentation should be encouraged, as it may help in solving some frequent problems and in improving precision in many real-life situations.

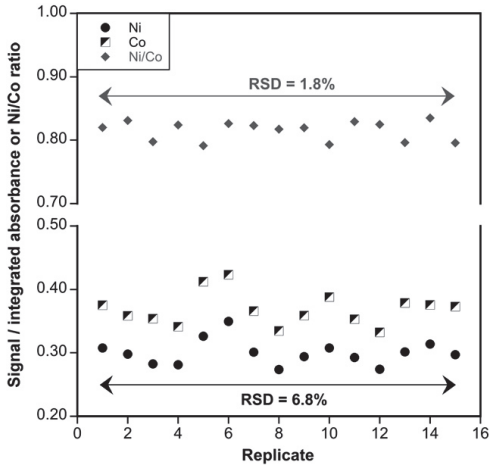


Fig. 3. Evolution of the Ni and Co signals obtained upon HR CS GFAAS measurement of a urine sample spiked with 1 ng Ni and 400 ng Co, showing the improved precision obtained when using the Co signal as internal standard for Ni. The same spectral interval shown in Fig. 2B was monitored.

3.3. Multi-element analysis

As stated in the introduction, *a priori*, the current potential for multi-element analysis of the HR CS GFAAS technique is limited owing to the narrow spectral bandwidth that is simultaneously monitored. However, it should be taken into account that, very often, the most important aspect is not to measure all the elements simultaneously, but instead to measure all the elements of interest from the same sample replicate (the same tube firing), which opens possibilities for sequential monitoring.

In practice, there are two possible situations only, either the elements of interest show similar volatilities or not. If the elements of interest show similar volatilities, if seems simple to use the same temperature program to vaporize them and atomize almost simultaneously. Then, truly simultaneous monitoring can be accomplished providing that i) there are atomic lines for these elements that are closely located and ii) the sensitivity ratio between these lines is of the same order as the concentration ratio in the samples of interest, as discussed recently by Welz et al. [12]. It is certainly not so frequent that both criteria can be met, but Welz and coworkers have used this approach to determine Co and V [17] and Cr and Fe [20] in crude oil.

In this work, we have investigated this possibility for the direct determination of a biological certified reference material (NIST 1566a Oyster tissue). Elements such as Co, Fe or Ni show many atomic lines and it seems feasible to determine them simultaneously, as all of them are non-volatile. Actually, this is a relative simple sample for direct analysis, since it is feasible to use a pyrolysis temperature sufficiently high to remove most matrix components (of organic nature) without risking analyte losses, such that the resulting analyte signals should not be significantly affected by matrix interferences [21,22,28]. Ni and Co showed atomic lines in the vicinity of 352.6 nm (Ni 352.454 nm, characteristic mass 30 pg; and Co 352.685 nm, characteristic mass 75 pg) that are suitable for determinations at the $\mu g\ g^{-1}$ level using 2–3 mg of sample, while Fe shows a doblet (352.604 and 352.617 nm, see Fig. S-2) that is much less sensitive (characteristic masses, 3 and 27 ng, respectively), which is fit for purpose in this case as the Fe content in the sample is much higher (approx. 500 $\mu g\ g^{-1}$).

Thus, analysis of the sample was undertaken, using the conditions shown in Table 3 and the methodology discussed in Section 2.4. As shown in Fig. 4, well-defined unimodal signals were obtained for the solid samples, signals that were very similar in shape and in peak area values to those obtained for aqueous standards, such that straightforward calibration with aqueous standard seemed to be feasible. The results presented in Table 4 proved that it is possible to obtain accurate values in this simple way, confirming the potential of HR CS GFAAS for direct and simultaneous multi-element analysis (three elements in this case) of solid samples, as long as the conditions discussed in the second paragraph of this section are fulfilled.

Table 3
Instrumental parameters used in the simultaneous determination of Co, Fe and Ni in NIST SRM 1566a Oyster tissue by means of solid sampling HR CS GFAAS.

Analyte	Ni	Fe	Fe	Co
Wavelength/nm	352.454	352.604	352.617	352.685
Number of pixels summed	3 (≈5.9 pm)	3 (≈5.9 pm)	3 (≈5.9 pm)	3 (≈5.9 pm)
Sample mass/mg	2–3			
Chemical modifier	5 μg Pd (added as $Pd(NO_3)_2$ solution)			

Temperature program

Step	Temperature/°C	Ramp/°C s^{-1}	Time/s	Gas flow/L min^{-1}
Drying	150	5	35	2
Pyrolysis	1000	50	30	2
Auto-zero	1000	0	5	0
Atomization	2500	1200	6	0
Cleaning	2600	500	4	2

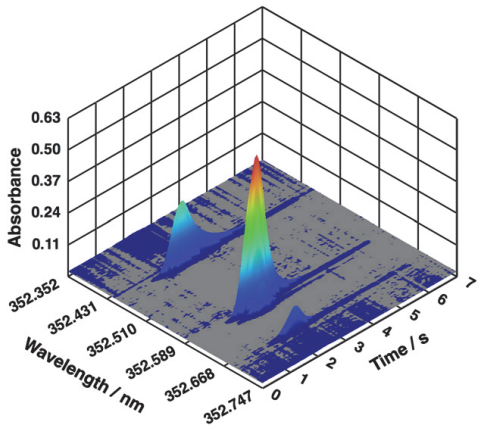


Fig. 4. Time- and wavelength-resolved absorbance spectra obtained upon the direct analysis of 2.795 mg of NIST SRM 1566a Oyster tissue by means of HR CS GFAAS using the conditions shown in Table 3.

The second situation, determination of elements showing very different volatilities, seems more complicated *a priori*. Indeed, if the idea is to use one atomization program only, compromise conditions have to be used owing to the different electrothermal behavior of the analytes. That is the reason why, when tackling this situation (determination of Cd and Fe in various types of samples [16,18,19]), Welz and coworkers proposed the use of two atomization temperatures, such that every analyte can be determine using its optimal atomization temperature.

In the current work, it is investigated if that situation (used of two atomization steps) can be taken even further. In fact, if two atomization steps are to be used, there is no actual need to use atomic lines that are closely located since wavelength modification has already been reported to take only 2 s for an HR CS AAS instrument, including all correction and optimization steps [12]. Thus, in theory, every element can be determined at the atomic line of choice, using the Ar flow conditions that fit better, and even using different chemical modifiers, or different amounts of the same chemical modifier, if needed (the sample can be cooled down and a second modifier solution can be added).

Again, a solid sample was selected to evaluate the feasibility of this strategy. A biological reference material with certified values for Cd and Ni was chosen, BCR 679 White cabbage. Obviously, Cd and Ni are elements of very different volatility. In fact, the use of the optimal atomization temperature for Ni represents an almost two-fold decrease in the sensitivity for Cd (see Fig. S-3), which could be expected since the residence time of a volatile element typically decreases with increasing temperatures, owing to diffusional losses. Still, there is a Ni atomic line (228.998 nm) that is very close to the main Cd atomic line (228.802 nm), such that it seems possible to try

Table 4
Results obtained for the simultaneous determination (n = 5) of Co, Fe and Ni in NIST SRM 1566a Oyster tissue by means of solid sampling HR CS GFAAS.

Wavelength/nm	Analyte	Result/μg g^{-1}	Certified value/μg g^{-1}
352.454	Ni	2.08 ± 0.20	2.25 ± 0.45
352.604	Fe	557 ± 23	539 ± 32
352.617	Fe	567 ± 31	539 ± 32
352.685	Co	0.59 ± 0.06	0.57 ± 0.11

The confidence intervals (C.I.) have been calculated as ± ts/√n, where t is the Student's t-distribution value for a probability level of 95%, s is the standard deviation and n is the number of replicate determinations.

Table 5
Instrumental parameters used in the simultaneous determination of Cd and Ni in BCR CRM 679 White cabbage by means of solid sampling HR CS GFAAS.

Analyte	Cd	Ni
Wavelength/nm	228.802	228.998
Number of pixels summed	3 (≈3.7 pm)	3 (≈3.7 pm)
Sample mass/mg	0.3–0.5	
Chemical modifier	1 μg Pd (added as $Pd(NO_3)_2$ solution)	

Temperature program

Step	Temperature/°C	Ramp/°C s^{-1}	Time/s	Gas flow/L min^{-1}
Drying	150	5	35	2
Pyrolysis	800	50	30	2
Auto-zero	800	0	5	0.1
Atomization	2300	1200	7	0.1
Cleaning	2600	500	4	2

to simultaneously monitor both signals, using suitable sample masses (approx. 0.5 mg), mini-flow conditions to adjust the sensitivity and a temperature high enough to atomize both elements. The detailed conditions are shown in Table 5. In this situation, well-defined absorption profiles can be obtained from the solid samples (as shown in Fig. 5), and their areas are comparable with those observed for aqueous standards.

Alternatively, a sequential approach can be used, selecting now two lines that cannot be monitored simultaneously (228.802 nm for Cd and 234.554 nm for Ni, another Ni line that shows appropriate sensitivity for this sample). The working conditions are shown in Table 6. In this case, atomization of Cd in undertaken first at 1300 ºC (a temperature that is appropriate for Ni pyrolysis) and then the conditions are modified, the temperature increases up to 2500 ºC (the optimal temperature to achieve the best temporal definition, with minimum tailing, for Ni atomic signal profiles) and Ni can be measured at the new wavelength, as illustrated in Fig. 6. In this case, and owing to the large difference in the analyte contents, a different and optimal amount of chemical modifier (Pd) was added before every step. Again, this approach provided well-defined signal profiles for solid standards and aqueous solutions, with comparable peak areas.

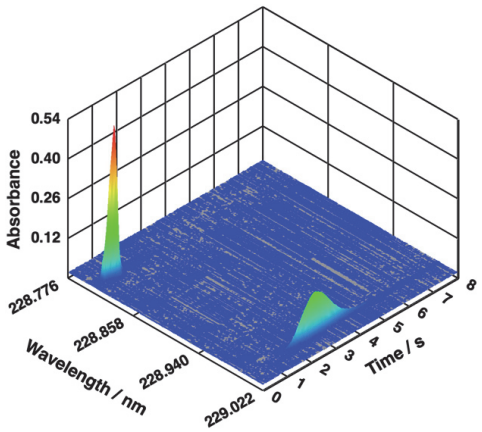


Fig. 5. Time- and wavelength-resolved absorbance spectra obtained upon the direct measurement of 0.453 mg of BCR CRM 679 White cabbage by means of HR CS GFAAS using the conditions shown in Table 5. The signal that appears on the left side corresponds to Cd (228.802 nm) and the signal on the right side with Ni (228.998 nm).

Table 6
Instrumental parameters used in the determination of Cd and Ni in BCR CRM 679 White cabbage by means of solid sampling HR CS GFAAS using a sequential monitoring approach (two different atomization steps during every tube firing).

Analyte	Cd	Ni
Wavelength/nm	228.802	234.554
Number of pixels summed	3 (≈3.7 pm)	3 (≈3.7 pm)
Sample mass/mg	0.1–0.3	

Temperature program

Step	Temperature/°C	Ramp/°C s^{-1}	Time/s	Gas flow/L min^{-1}
Addition of 10 μL of chemical modifier (Pd, 30 mg L^{-1})				
Drying	150	5	35	2
Pyrolysis	700	300	30	2
Auto-zero	700	0	5	0.1
Atomization	1300	1200	5	0.1
Cool down	20	100	10	2
Addition of 10 μL of chemical modifier (Pd, 100 mg L^{-1})				
Drying	150	5	35	2
Pyrolysis[a]	1300	500	1	2
Auto-zero	1300	0	5	0.1
Atomization	2500	1200	5	0.1
Cleaning	2600	500	4	2

[a] This second pyrolysis step would not be really necessary from a scientific point of view, but it is compulsory due to the configuration of the software of the instrument.

Table 7 shows the results obtained for Cd and Ni using both approaches. As can be seen, in both cases the agreement with the reference values is excellent, such that it is possible to use any of them. However, the second approach can be much more flexible for multi-element analysis, as there are no more requirements to find close lines characterized by a suitable sensitivity ratio. Instead, every element can be determined under optimal conditions. The only requirement that is necessary to fulfill is that the volatilities of the elements of interest should be different enough such that no losses of the less volatile element occur during atomization of the most volatile analyte. This aspect can also be further ensured using chemical modifiers.

Moreover, the sequential approach can be expanded even further if the difference in the analyte volatilities is sufficiently high. Fig. 7 shows how it is possible to sequentially and selectively monitor, during every single replicate, a very volatile analyte (Hg), an element of medium volatility (Zn) and two elements of low volatility that showed closed lines (Mn and Cr), using a triple atomization program with different wavelengths. In fact, MnO_4^- is used as chemical

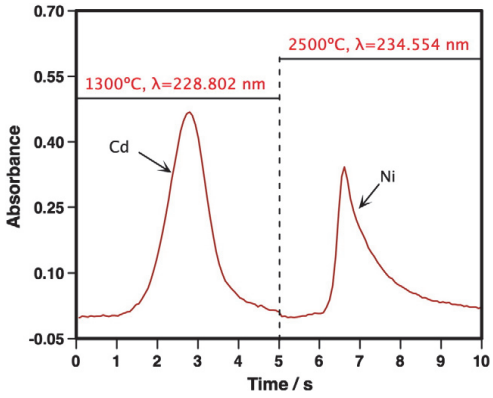


Fig. 6. Sequential and selective atomization of Cd and Ni as obtained for the direct measurement of a solid sampling replicate (0.266 mg of BCR CRM 679 White cabbage) by means of HR CS GFAAS using the conditions shown in Table 6.

Table 7
Results obtained for the determination (n = 5) of Cd and Ni in BCR CRM 679 White cabbage by means of solid sampling HR CS GFAAS using two different approaches, truly simultaneous monitoring (conditions shown in Table 5), or sequential monitoring (use of two different atomization steps, as shown in Table 6). In both cases, Cd and Ni were always monitored from every sample replicate.

Analyte	Result simultaneous method/μg g^{-1}	Result sequential method/μg g^{-1}	Certified value/μg g^{-1}
Cd	1.69 ± 0.13	1.60 ± 0.14	1.66 ± 0.07
Ni	27.3 ± 1.7	27.6 ± 1.9	27.0 ± 0.8

The confidence intervals (C.I.) have been calculated as ± ts/√n, where t is the Student's t-distribution value for a probability level of 95%, s is the standard deviation and n is the number of replicate determinations.

modifier for Hg [40–42], and that is the reason why Mn signal appears in the Figure, as there is a very insensitive Mn line close to the main atomic line for Cr.

4. Conclusions

While obviously the current configuration of commercially available HR CS GFAAS instrumentation has not been designed having multi-line monitoring in mind, there is still potential to do so. Monitoring various atomic lines of the same element or of different elements is sometimes possible, which provides a mean for expanding the linear range (e.g., monitoring of multiplets), or for improving precision and correcting for matrix-effects (use of an internal standard).

Furthermore, direct and multi-element analysis of solid samples is also possible on some occasions, as demonstrated in the current work, either by monitoring various atomic lines that are sufficiently close (truly simultaneous monitoring) or, if these are lacking, by opting for a selective and sequential atomization of the elements of interest during every single replicate, which seems to be a more flexible approach.

Overall, the potential of HR CS GFAAS instrumentation to monitor multiple lines may seem limited when compared with other multi-element techniques (e.g., inductively coupled plasma-based methods), but it represents a significant step forward if compared with traditional line source AAS devices. It is these authors' opinion that the current owners of HR CS GFAAS instrumentation may find

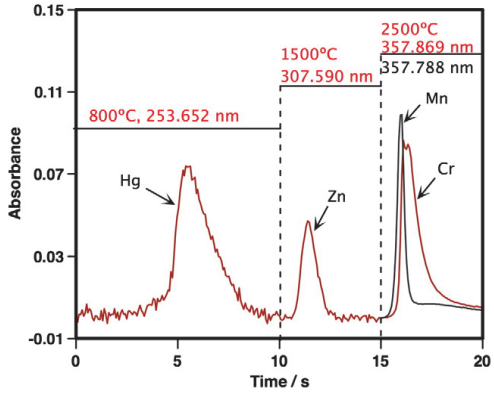


Fig. 7. Example of sequential and selective atomization of Hg (5 ng), Zn (20 ng) and Cr (40 pg) as obtained for a single HR CS GFAAS replicate of an aqueous standard solution. $KMnO_4$ and Pd were used as chemical modifiers. The signal of Mn was also simultaneously monitored with that of Cr owing to the proximity of their atomic lines, but was actually divided by a factor of 5 to keep the same scale.

favorable situations to profit from some of the multi-line features discussed before, which are currently underused.

Supplementary materials related to this article can be found online at doi:10.1016/j.sab.2011.03.008.

Acknowledgments

This work has been funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Project CTQ2009-08606) and the Aragon Government ("Programa de apoyo a la I + D + I" from ARAID Foundation and "Obra Social de IberCaja", with additional support from Inycom).

References

[1] H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, Observation, identification and correction of structured molecular background by means of continuum source AAS — determination of selenium and arsenic in human urine, J. Anal. At. Spectrom. 15 (2000) 137–141.
[2] U. Heitmann, M. Schütz, H. Becker-Ross, S. Florek, Measurements on the Zeeman-splitting of analytical lines by means of a continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometer with a linear charge coupled device array, Spectrochim. Acta Part B 51 (1996) 1095–1105.
[3] B. Welz, High-resolution continuum source AAS: the better way to perform atomic absorption spectrometry, Anal. Bioanal. Chem. 381 (2005) 69–71.
[4] D.L.G. Borges, A.F. da Silva, B. Welz, A.J. Curtius, U. Heitmann, Determination of lead in biological samples by high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry with direct solid sampling, J. Anal. At. Spectrom. 21 (2006) 763–769.
[5] M. Resano, J. Briceño, M.A. Belarra, Direct determination of Hg in polymers by solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry. A comparison of the performance of line source and continuum source instrumentation, Spectrochim. Acta Part B 64 (2009) 520–529.
[6] R.G.O. Araujo, B. Welz, F. Vignola, H. Becker-Ross, Correction of structured molecular background by means of high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry. Determination of antimony in sediment reference materials using direct solid sampling, Talanta 80 (2009) 846–852.
[7] M. Resano, E. Mozas, C. Crespo, J. Briceño, J. del Campo Menoyo, M.A. Belarra, Solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry to monitor the biodistribution of gold nanoparticles in mice tissue after intravenous administration, J. Anal. At. Spectrom. 25 (2010) 1864–1873.
[8] U. Heitmann, B. Welz, D.L.G. Borges, F.G. Lepri, Feasibility of peak volume, side pixel and multiple peak registration in high-resolution continuum source atomic absorption spectrometry, Spectrochim. Acta Part B 62 (2007) 1222–1230.
[9] J. Briceño, M.A. Belarra, K.A.C. De Schamphelaere, S. Vanblaere, C. Janssen, F. Vanhaecke, M. Resano, Direct determination of Zn in individual *Daphnia magna* specimens by means of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry, J. Anal. At. Spectrom. 25 (2010) 503–510.
[10] B. Welz, F.G. Lepri, R.G.O. Araujo, S.L.C. Ferreira, M.D. Huang, M. Okruss, H. Becker-Ross, Determination of phosphorus, sulfur and the halogens using high-temperature molecular absorption spectrometry in flames and furnaces — a review, Anal. Chim. Acta 647 (2009) 137–148.
[11] U. Heitmann, H. Becker-Ross, S. Florek, M.D. Huang, M. Okruss, Determination of non-metals *via* molecular absorption using high-resolution continuum source absorption spectrometry and graphite furnace atomization, J. Anal. At. Spectrom. 21 (2006) 1314–1320.
[12] B. Welz, S. Morés, E. Carasek, M.G.R. Vale, M. Okruss, H. Becker-Ross, High-resolution continuum source atomic and molecular absorption spectrometry — a review, Appl. Spectrosc. Rev. 45 (2010) 327–354.
[13] H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, M.D. Huang, M. Okruss, B. Radziuk, Continuum source atomic absorption spectrometry and detector technology: a historical perspective, Spectrochim. Acta Part B 61 (2006) 1015–1030.
[14] J.M. Harnly, The future of atomic absorption spectrometry: a continuum source with a charge coupled array detector, J. Anal. At. Spectrom. 14 (1999) 137–146.
[15] M. Resano, E. García-Ruiz, High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry: Is it as good as it sounds? a critical review, Anal. Bioanal. Chem. 399 (2011) 323–330.
[16] F. Vignola, D.L.G. Borges, A.J. Curtius, B. Welz, H. Becker-Ross, Simultaneous determination of Cd and Fe in sewage sludge by high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry with slurry sampling, Microchem. J. 95 (2010) 333–336.
[17] I.M. Dittert, J.S.A. Silva, R.G.O. Araujo, A.J. Curtius, B. Welz, H. Becker-Ross, Simultaneous determination of cobalt and vanadium in undiluted crude oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry, J. Anal. At. Spectrom. 25 (2010) 590–595.
[18] L.M.G. dos Santos, B. Welz, R.G.O. Araujo, S.C. Jacob, M.G.R. Vale, A. Martens, I.B. Gonzaga Martens, H. Becker-Ross, Simultaneous determination of Cd and Fe in beans and soil of different regions of Brazil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry and direct solid sampling, J. Agric. Food Chem. 57 (2009) 10089–10094.
[19] L.M.G. dos Santos, R.G.O. Araujo, B. Welz, S.d.C. Jacob, M.G.R. Vale, H. Becker-Ross, Simultaneous determination of Cd and Fe in grain products using direct solid sampling and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry, Talanta 78 (2009) 577–583.
[20] I.M. Dittert, J.S.A. Silva, R.G.O. Araujo, A.J. Curtius, B. Welz, H. Becker-Ross, Direct and simultaneous determination of Cr and Fe in crude oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry, Spectrochim. Acta Part B 64 (2009) 537–543.
[21] M. Resano, F. Vanhaecke, M.T.C. de Loos-Vollebregt, Electrothermal vaporization for sample introduction in atomic absorption, atomic emission and plasma mass spectrometry — a critical review with focus on solid sampling and slurry analysis, J. Anal. At. Spectrom. 23 (2008) 1450–1475.
[22] M.A. Belarra, M. Resano, F. Vanhaecke, L. Moens, Direct solid sampling with electrothermal atomization/vaporization. What for and how? Trends Anal. Chem. 21 (2002) 828–839.
[23] B. Welz, M.G.R. Vale, D.L.G. Borges, U. Heitmann, Progress in direct solid sampling analysis using line source and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry, Anal. Bioanal. Chem. 389 (2007) 2085–2095.
[24] M.G.R. Vale, N. Oleszczuk, W.N.L. dos Santos, Current status of direct solid sampling for electrothermal atomic absorption spectrometry — a critical review of the development between 1995 and 2005, Appl. Spectrosc. Rev. 41 (2006) 377–400.
[25] K.-C. Friese, V. Krivan, A solid-sampling system for a transversely heated graphite furnace and its application to trace element analysis of high-purity tantalum powders by atomic absorption spectrometry, Spectrochim. Acta Part B 53 (1998) 1069–1078.
[26] M.A. Belarra, M. Resano, J.R. Castillo, Theoretical evaluation of solid sampling-electrothermal atomic absorption spectrometry for screening purposes, J. Anal. At. Spectrom. 14 (1999) 547–552.
[27] B. Welz, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, High-resolution continuum source AAS — the better way to do atomic absorption spectrometry, Wiley-VCH, Weinheim, 2005.
[28] M. Resano, M. Aramendia, E. Garcia-Ruiz, C. Crespo, M.A. Belarra, Solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for the direct determination of silver at trace and ultratrace levels, Anal. Chim. Acta 571 (2006) 142–149.
[29] M. Resano, J. Briceño, M.A. Belarra, Direct determination of phosphorus in biological samples using a solid sampling-high resolution-continuum source electrothermal spectrometer: comparison of atomic and molecular absorption spectrometry, J. Anal. At. Spectrom. 24 (2009) 1343–1354.
[30] J.L. Raposo Jr., S.R. Oliveira, J.A. Nóbrega, J.A.G. Neto, Internal standardization and least-squares background correction in high-resolution continuum source flame atomic absorption spectrometry to eliminate interferences on determination of Pb in phosphoric acid, Spectrochim. Acta Part B 63 (2008) 992–995.
[31] S.L.C. Ferreira, A.S. Souza, G.C. Brandao, H.S. Ferreira, W.N.L. dos Santos, M.F. Pimentel, M.G.R. Vale, Direct determination of iron and manganese in wine using the reference element technique and fast sequential multi-element flame atomic absorption spectrometry, Talanta 74 (2008) 699–702.
[32] H.D. Projahn, U. Steeg, J. Sanders, E. Vanclay, Application of the reference-element technique for fast sequential flame atomic-absorption spectrometry, Anal. Bioanal. Chem. 378 (2004) 1083–1087.
[33] K. Miranda, A.G.G. Dionísio, E.R. Pereira-Filho, Copper determination in sugar cane spirits by fast sequential flame atomic absorption spectrometry using internal standardization, Microchem. J. 96 (2010) 99–101.
[34] S.R. de Oliveira, J.A.G. Neto, Evaluation of Bi as internal standard to minimize matrix effects on the direct determination of Pb in vinegar by graphite furnace atomic absorption spectrometry using Ru permanent modifier with co-injection of $Pd/Mg(NO_3)_2$, Spectrochim. Acta Part B 62 (2007) 1046–1050.
[35] A.P. Oliveira, J.A.G. Neto, J.A. Nóbrega, P.V. Oliveira, Use of the internal standardization for difficult sampling by graphite furnace atomic absorption spectrometry, Talanta 64 (2004) 334–337.
[36] P.R.M. Correia, P.V. Oliveira, J.A.G. Neto, J.A. Nóbrega, Silver as internal standard for simultaneous determination of Cd and Pb in whole blood by electrothermal atomic absorption spectrometry, J. Anal. At. Spectrom. 19 (2004) 917–922.
[37] B. Radziuk, N.P. Romanova, Y. Thomassen, Evaluation of internal standardisation in electrothermal atomic absorption spectrometry, Anal. Commun. 36 (1999) 13–16.
[38] P.R.M. Correia, P.V. Oliveira, Cobalt as internal standard for arsenic and selenium determination in urine by simultaneous atomic absorption spectrometry, Talanta 67 (2005) 46–53.
[39] N.M. Caldas, S.R. Oliveira, J.A.G. Neto, Feasibility of internal standardization in the direct and simultaneous determination of As, Cu and Pb in sugar-cane spirits by graphite furnace atomic absorption spectrometry, Anal. Chim. Acta 636 (2009) 1–5.
[40] A.F. da Silva, B. Welz, A.J. Curtius, Noble metals as permanent chemical modifiers for the determination of mercury in environmental reference materials using solid sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry and calibration against aqueous standards, Spectrochim. Acta Part B 57 (2002) 2031–2045.
[41] I. López-García, M. Sánchez-Merlos, M. Hernández-Córdoba, Determination of mercury in soils and sediments by graphite furnace atomic absorption spectrometry with slurry sampling, Spectrochim. Acta Part B 52 (1997) 2085–2092.
[42] M. Resano, E. García-Ruiz, M. Aramendía, M.A. Belarra, Solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for Hg monitoring in soils. Performance as a quantitative and as a screening method, J. Anal. At. Spectrom. 20 (2005) 1374–1390.

Supplementary electronic material

Figure S-1. Calibration curves for aqueous standard solutions and for blood and urine samples (originally Ni-free, and then spiked with known amounts of Ni) obtained upon HR CS GFAAS monitoring of the 231.096 nm Ni atomic line when **A)** not using any internal standard or **B)** when using the signal obtained for Co, as monitored at the 231.136 nm atomic line, as internal standard. All solutions and samples were also spiked with a fixed amount of Co (40 mg L^{-1}). Urine and blood samples were diluted with milli-Q water 1:1 and 1:3, respectively.

Figure S-2. Wavelength-resolved time-integrated absorbance spectrum showing the signals for Ni (352.454 nm), Fe (352.604 and 352.617 nm) and Co (352.685 nm), as obtained after HR CS GFAAS measurement of an aqueous solution containing 6 ng of Ni, 1500 ng of Fe and 1.5 ng of Co using the conditions shown in Table 3.

Figure S-3. Atomization curves obtained for Cd (60 pg) and Ni (3 ng) in the presence of 1 µg of Pd as chemical modifier. A pyrolysis temperature of 700 ºC was used throughout the measurements. The atomic lines of 228.802 nm (Cd) and 228.998 nm (Ni) were selected for the measurements.

Figure S-1a

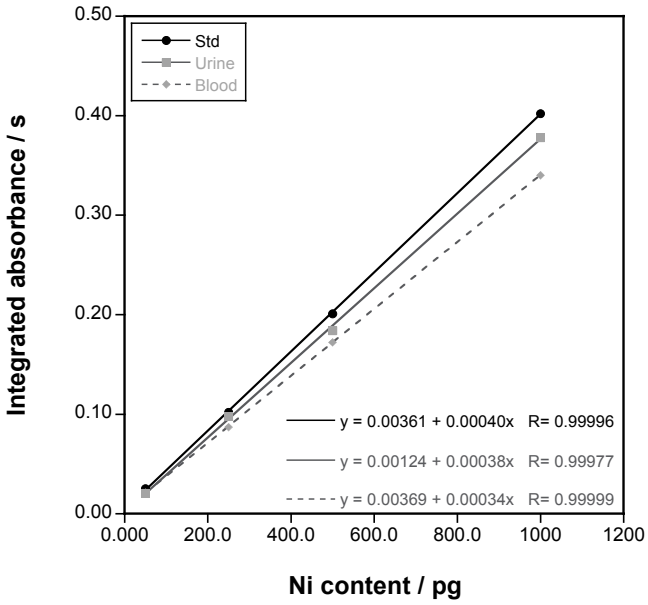


Figure S-1b

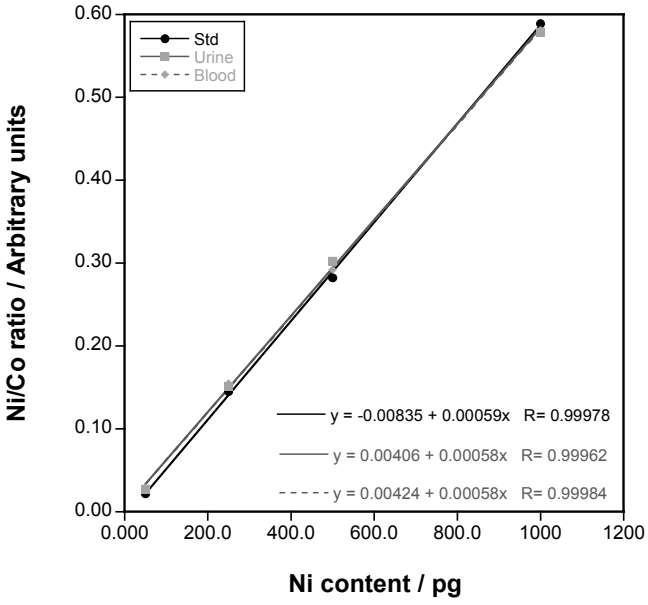


Figure S-2

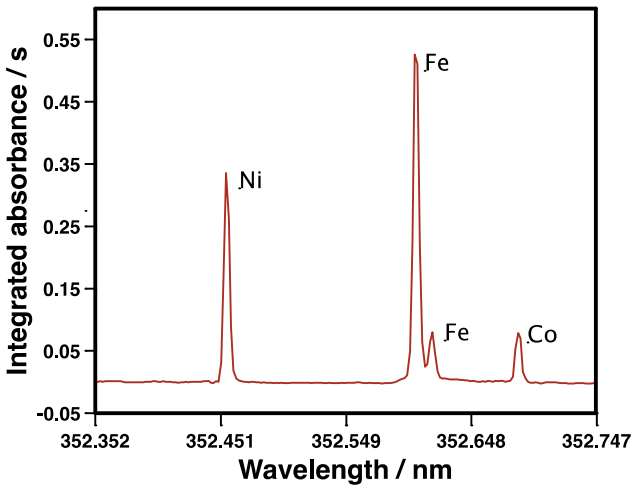
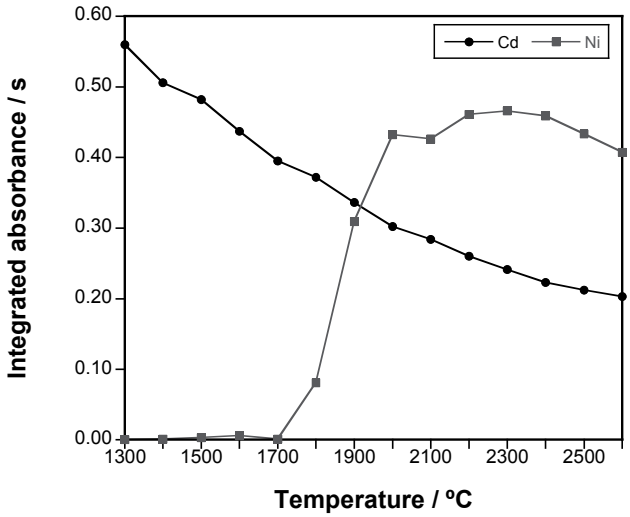


Figure S-3



analytical chemistry

Article

pubs.acs.org/ac

Direct Trace-Elemental Analysis of Urine Samples by Laser Ablation-Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry after Sample Deposition on Clinical Filter Papers

Maite Aramendía,[†] Luis Rello,[‡,§] Frank Vanhaecke,[∥] and Martín Resano*[,§]

[†]Centro Universitario de la Defensa-Academia General Militar de Zaragoza, Carretera de Huesca s/n, 50090, Zaragoza, Spain

[‡]Department of Clinical Biochemistry, "Miguel Servet" Universitary Hospital, Paseo Isabel La Católica 1-3, 50009 Zaragoza, Spain

[∥]Department of Analytical Chemistry, Ghent University, Krijgslaan 281-S12, 9000 Ghent, Belgium

[§]Department of Analytical Chemistry, University of Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, Spain

Supporting Information

ABSTRACT: Collection of biological fluids on clinical filter papers shows important advantages from a logistic point of view, although analysis of these specimens is far from straightforward. Concerning urine analysis, and particularly when direct trace elemental analysis by laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICPMS) is aimed at, several problems arise, such as lack of sensitivity or different distribution of the analytes on the filter paper, rendering obtaining reliable quantitative results quite difficult. In this paper, a novel approach for urine collection is proposed, which circumvents many of these problems. This methodology consists on the use of precut filter paper discs where large amounts of sample can be retained upon a single deposition. This provides higher amounts of the target analytes and, thus, sufficient sensitivity, and allows addition of an adequate internal standard at the clinical lab prior to analysis, therefore making it suitable for a strategy based on unsupervised sample collection and ulterior analysis at referral centers. On the basis of this sampling methodology, an analytical method was developed for the direct determination of several elements in urine (Be, Bi, Cd, Co, Cu, Ni, Sb, Sn, Tl, Pb, and V) at the low μg L^{-1} level by means of LA-ICPMS. The method developed provides good results in terms of accuracy and LODs ($\leq$1 μg L^{-1} for most of the analytes tested), with a precision in the range of 15%, fit-for-purpose for clinical control analysis.

Already in 1963, capillary blood dried on filter paper (FP) was used as a clinical specimen in the U.K. to screen for phenylketonuria in newborns.[1] Because of its inherent advantages, among which the ease of (minimally invasive) collection, preservation, and transportation are noteworthy, this method for collecting blood samples has become increasingly popular in the years to date and is nowadays deployed in a wide variety of bioanalytical contexts. In this regard, an increasing amount of biomarkers are detected in dried blood spots (DBS) for different purposes, such as screening for metabolic diseases in newborns,[2] therapeutic drug monitoring,[3] pharmacokinetic[4] or toxicological[5,6] and forensic[5] studies.

More recently, some of these advantages have prompted the collection of other biological fluids on FP, including dried urine spots (DUS).[7−10] However, although not entirely unknown in the clinical setting, collection and analysis of DUS is not so generalized as that of DBS. This situation is easy to understand if one considers that most analytical techniques are designed for liquid/digested samples and, thus, switching to the analysis of dried spots often implies additional problems for the analyst, such as lower sensitivities or enhanced matrix effects.[11] While use of minimally invasive collection of capillary blood instead of venous blood clearly justifies the effort in the case of DBS (especially when applied to newborns), this is not the case of urine, which is probably the easiest biological fluid to collect and analyze.

In fact, the reasons that make this working methodology especially interesting in the case of DUS are mostly related with logistics. In this regard the challenges associated with urine conservation (usually frozen at −20 °C or −80 °C) and/or transportation should not be undervalued, especially because many clinical laboratories often have to deal with hundreds of samples on a daily basis. Conversely, the FP matrix has a stabilizing effect[12] and thus, collection of dried spots facilitates preservation (possible at room temperature for many analyses[13]) and transport of these samples, which could be sent over large distances by regular mail for analysis at referral centers.

This last feature cannot be underestimated. The lower costs associated with collection, transport, preservation, and analysis of DUS could be helpful in, e.g., bringing mass screening studies to developing countries or improving the quality of the information derived from other large population-based studies involving collection of urine specimens. It has been proved that

Received: July 6, 2012
Accepted: August 31, 2012
Published: August 31, 2012

ACS Publications © 2012 American Chemical Society

dx.doi.org/10.1021/ac3018839 | Anal. Chem. 2012, 84, 8682−8690

a major complicating factor for this kind of studies is finding individuals willing/able to come to the clinic to donate sample, which often restricts the number of samples available, sometimes leading to biased results.[13] Development of suitable methods of analysis based on DUS can therefore represent a valid way for addressing this issue, allowing one to incorporate collection protocols that could be carried out by the study participants with minimal to no oversight from study staff members, even at their homes. Such a sampling methodology could bring about a major advantage for chronic patients as well, helping to reduce their number of mandatory visits to the clinic. As a result, efforts must be done to develop analytical methods for as many analytes as possible, allowing urine collection in an independent (nonsupervised) way by the patients or study participants while assuring, however, the best performance for these methods.

In this paper, development of such an analytical method for the determination of trace elements in urine is aimed at. This kind of elemental analysis is important in the clinical setting for different reasons, like revealing exposure to toxic metals and metalloids (such as Be, Cd, Ni, Pb, Sn, or Tl[5]), detecting prosthesis degradation (Co or V[14]), monitoring the levels of metals/metalloids involved in pharmaceutical treatments (Bi for treating peptic ulcers[15] or Sb for treating leishmaniasis[16]) or because the element/s considered play a major role in a given medical condition (such as Cu for Wilson's disease[17]). As previously stated, the FP matrix has a stabilizing effect for most analytes, although the rate of sample degradation will vary from an analyte to the next.[12] In this regard, trace elements could be especially well suited for this kind of sample collection/preservation. In fact, some works carried out on dried blood spots have found Pb contents to be stable over periods longer than 2 years for FPs stored at room temperature.[18] In principle, there is no reason why the same conclusion could not be extended to other elements in other biological samples such as urine, which would open the possibility for different kind of studies (e.g., epidemiological, trend, or forensic studies) to be carried out on archived FP samples, much easier to store and to access than liquid samples and thus better suited for biobanking.[19]

However, and in spite of the potential interest of this approach, there is only one attempt to develop an analytical method for the determination of trace elements in urine after deposition on a solid support described in the literature.[20] In that paper, Kumtabtim and co-workers made use of laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICPMS), a powerful direct solid sampling technique that seems well-suited for analysis of this kind of sample. In fact, this analytical technique is capable of providing multielemental and isotopic information without the need for digestion and/or extraction steps prior to analysis.[21] However, use of LA-ICPMS for the direct analysis of urine samples deposited on FPs is not free from problems. As documented in ref 20, one of the main problems encountered when trying to analyze DUS by LA-ICPMS is the lack of sensitivity. To address this issue, Kumtabtim et al. used hydrophobic Teflon slides for depositing the samples instead of one of the two commercially available FP types registered by the U.S. Food and Drug Administration (FDA) as Class II Medical Devices,[22] thus minimizing sample dispersion and maximizing signal intensities. However, urine collection on Teflon slides can be hardly considered as an ideal method for maintaining sample integrity over time and/or through delivery by regular mail, as the sample is not embedded in the Teflon but it only sticks to its surface. Teflon hydrophobicity also makes drying of the sample more cumbersome, and this is probably the reason why the authors only analyzed 1 μL urine droplets and recommended their method for situations where very small quantities of urine were available only and not as a general method of urine analysis. Hence, it seems clear that developing a more general analytical method for urine analysis, based on the use of the well accepted clinical FPs, would be much more relevant for the clinical field.

It is the purpose of this work to develop a method for direct analysis of trace elements in urine samples adsorbed and dried on clinical FPs, and to the best of the authors' knowledge, this is the first paper that describes this possibility. The final goal of the study is to provide a method that would be suitable for unsupervised collection of samples by the patients-subjects of the study themselves, with minimal intervention of the lab staff, yet providing sufficient control parameters as to ensure an adequate performance of the method. For this purpose, the LA-ICPMS technique was evaluated and two methodological aspects were investigated in detail. First, the calibration methodology required special attention, and particularly, the addition and use of an appropriate internal standard to correct for different ablation efficiencies and/or sensitivity drifts seemed mandatory. On the other hand, implementation of a novel strategy for sample collection maximizing sensitivity while minimizing undesired chromatographic effects was needed as well. Combining all these aspects into an easy to implement and economically affordable protocol was the challenge addressed in this work.

EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals and Reagents. All multielement and single-element solutions used for preparation of calibration standards, spiking of the samples, and preparation of the Pt internal standard solution were prepared by mixing and diluting appropriate quantities of 1 g L^{-1} mono elemental standards for ICPMS (Inorganic Ventures) with diluted nitric acid until a final concentration of 0.14 M HNO_3. Pro-analysis nitric acid was purchased from Merck (Germany) and further purified in a PTFE sub-boiling system. Ultrapure water with a resistivity $\geq$18.2 mΩ cm was obtained from a Direct-Q3 system (Millipore, France). Both the ^{111}Cd-enriched (96.44% ^{111}Cd) and the ^{65}Cu-enriched standards (94.75% ^{65}Cu) were purchased as the solid oxide from Campro Scientific (The Netherlands). For lead, the Standard Reference Material 983 from NIST (National Institute of Standards and Technology) was used. It is available as a metallic wire and has a certified atom percentage of 92.1497 $\pm$ 0.0041% in ^{206}Pb. All materials were brought into solution with concentrated nitric acid.

Whatman no. 903 (formerly Schleicher & Schuell) paper cards (lot W-092) were obtained from Whatman International Ltd. (U.K.) and were printed for DBS analysis at a local distributor. This is one of the two commercial paper sources registered by the FDA as Class II Medical Devices.[22] Discs (16 mm diameter) were punched out of these cards using a manual paper punch (Artemio, Wavre, Belgium).

Preparation of Samples and Standards. Clincheck Urine Control Level II was obtained from Recipe Chemicals + Instruments GmbH (Germany). This reference material is provided as lyophilized material which, once reconstituted with 10 mL of deionized water, contains certified quantities of several elements, including most of the elements targeted in this study: V, Co, Ni, Cu, Cd, Sn, Sb, Tl, and Pb. For checking

dx.doi.org/10.1021/ac3018839 | Anal. Chem. 2012, 84, 8682−8690

performance of the method on the extreme low and high mass range, this material was spiked with Be and Bi (originally absent) at a final concentration of 10 $\mu g\ L^{-1}$ for both elements. Small spiking volumes, ensuring a dilution factor lower than 3%, were used to maintain the sample matrix unchanged.

Real urine samples from three healthy volunteers were obtained from the Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza, Spain). The three samples were characterized for their trace elemental composition via pneumatic nebulization (PN)-SF-ICPMS after 10-fold sample dilution with 0.14 M HNO_3. External calibration with aqueous standards, with Rh added as internal reference, was used for this analysis.

One of these real samples was used for preparation of matrix-matched calibration standards. For this purpose, eight 1 mL sample aliquots were spiked with small volumes of multielement solutions prepared in 0.14 M HNO_3 as to obtain a concentration range of spiked amounts from 5 to 500 $\mu g\ L^{-1}$ and ensuring the same dilution factor (lower than 3%) in all cases. The other two samples were spiked in a similar way to obtain a final added concentration of 20 $\mu g\ L^{-1}$ for all of the analytes of interest and were analyzed for further validation of the methodology proposed.

The potential of isotope dilution (ID) was also tested for the determination of Cd, Cu, and Pb in the Clincheck reference material. For this purpose, a stock multielement tracer solution enriched in ^{111}Cd, ^{65}Cu, and ^{206}Pb was prepared and its exact isotopic composition (Supporting Information) determined by reverse ID.

FP discs for LA-ICPMS analysis with the different calibration strategies tested were prepared as described below. In all cases, once dried, all paper discs were kept in sealed plastic bags at room temperature until analysis.

External Calibration: Internal Standard Spiking in Liquid Form. Aliquots (1 mL) of each of the matrix-matched standards and samples investigated were spiked with 10 μL of a 10 mg L^{-1} Pt standard solution. After homogenization, 300 μL of the spiked samples/standards were applied with a micropipet onto 16 mm diameter FP discs placed on disposable polystyrene (PS) weighing boats. Samples were left to dry at room temperature for at least 4 h.

External Calibration: Internal Standard Spiking after Drying. Aliquots (300 μL) of each of the matrix-matched standards and samples investigated were directly applied with a micropipet onto 16 mm diameter FP discs placed on disposable PS weighing boats. Samples were left to dry at room temperature for at least 4 h. Next, 300 μL of a 100 $\mu g\ L^{-1}$ Pt solution were applied over each of the dried paper discs containing the urine standards/samples and were allowed to dry for another additional 4 h.

Isotope Dilution Calibration. Isotope ratio for the analytes was measured in three different specimens: (i) the sample under investigation (Clincheck), for this purpose, 300 μL aliquots of the reconstituted sample were applied and dried on 16 mm diameter precut FP discs; (ii) the enriched tracer used for spiking the sample, 1 mL of 0.14 M nitric acid solution was spiked with 10 μL of the stock multielement tracer solution and 300 μL aliquots of the resulting solution were applied and dried on 16 mm diameter precut FP discs; and (iii) the sample + tracer blend, using two different spiking approaches, in liquid form and after drying. For addition of the tracer in liquid form, an aliquot of 1 mL of Clincheck reference material was spiked with 10 μL of the stock multielement tracer solution. After homogenization, 300 μL aliquots of the spiked sample were applied and dried on 16 mm diameter precut FP discs. For addition of the tracer after drying, 300 μL aliquots of the reconstituted Clincheck sample were applied on precut FPs. After drying, 300 μL of the diluted (100 times) multielement stock tracer solution were applied on the paper discs containing the urine reference sample and were allowed to dry for another additional 4 h.

Instrumentation and Signal Acquisition Protocol for Quantitative Analysis of Dried Urine Spots by Means of LA-ICPMS. All measurements were carried out using a UP193HE ArF* 193 nm excimer laser from New Wave Research Inc. coupled to an Element XR sector field ICPMS instrument (Thermo Scientific, Germany). The standard ablation cell (30 cm^3) was used throughout the study, with capacity for housing 4 FP discs simultaneously.

Measuring conditions on both instruments were adjusted for maximum sensitivity, plasma robustness, and minimum influence of interferences on the analyte signals and are summarized in Table 1. On the ICPMS side, selection of the nuclides monitored and mass resolution were carefully considered. Low-resolution mode ($R \approx 300$) was used whenever possible to maximize signal intensities. However, monitoring of V, Co, Ni, and Cu needed medium resolution ($R \approx 4000$) to overcome significant polyatomic interferences. Measurement of both sets of analytes was done in separate runs, as changing the resolution mode consumes too long a time interval (2 s per resolution change) as to integrate it into a single measurement (typically 40 s long).

Table 1. LA-ICPMS Acquisition Parameters for Quantitative Analysis

laser ablation parameters	New Wave UP193HE
energy density on sample surface	0.8−1.6 J cm^{-2}
repetition rate	20 Hz
crater spot size	400 μm
ablation mode	raster mode, 400 $\mu m\ s^{-1}$ translation speed
ablation time per replicate	40 s (10 s gas blank, 5 s stabilization, 25 s integration time)
ablation cell volume	≈ 30 cm^3; capacity for up to 4 PS-DUS simultaneously
carrier gas (He) through cell	0.5−0.7 L min^{-1} (optimized daily)
ICPMS parameters	**Thermo Element XR**
rf power	850 W
Ar plasma/auxiliary flow rates	15.0/1.0 L min^{-1}
make-up (Ar) gas flow rate	0.5−0.7 L min^{-1} (optimized daily)
sampling cone and skimmer	Al
lens voltages	optimized daily for maximum sensitivity
scanning mode	E-scan
settling time	1 ms
dwell time per acquisition point	5 ms
number of acquisition points per peak	5 (low resolution) 7 (medium resolution)
mass window scanned	5% (low resolution) 50% (medium resolution)
acquisition time per replicate	55 s
nuclides monitored in low res.	$^{9}Be^+$, $^{111}Cd^+$, $^{118}Sn^+$, $^{121}Sb^+$, $^{205}Tl^+$, $^{206}Pb^+$, $^{209}Bi^+$
nuclides monitored in medium res. (main polyatomic interferences)	$^{51}V^+$($^{35}Cl^{16}O^+$), $^{59}Co^+$($^{36}Ar^{23}Na^+$, $^{43}Ca^{16}O^+$), $^{60}Ni^+$($^{44}Ca^{16}O^+$, $^{23}Na^{37}Cl^+$), $^{63}Cu^+$($^{40}Ar^{23}Na^+$, $^{38}Ar^{25}Mg^+$)

As for the laser parameters, best conditions for the analytes of interest were daily optimized by ablating a FP impregnated with a matrix-matched standard spiked with 50 $\mu g\ L^{-1}$ of all of the target elements. The parameters used are also shown in Table 1.

Three replicate measurements were acquired per paper disc. Every replicate measurement consisted of 40 s ablation time performed in the center of the precut paper discs in order to avoid the influence of chromatographic enrichment on the disc rim (see the Urine Deposition on the FPs and Conditions for Ablation section). The first 10 s were carried out with the laser shutter closed, and the corresponding signals were used as gas blank. After 5 s for stabilization, the following 25 s of the quasi-steady signal obtained were used for integration of the signal. Net signal intensities (corrected for the contribution of the gas blank) normalized to the $^{195}Pt^{+}$ signal were used for obtaining all analytical results.

For analysis of the samples with external calibration using matrix-matched standards, a calibration curve was acquired at the beginning of every working session and samples were ablated afterward. For all standards and samples, the average of three replicate measurements on a single precut saturated (PS)-DUS specimen (see the section Urine Deposition on the FPs and Conditions for Ablation) was calculated. For analysis with isotope dilution calibration, each sample determination consisted of the sequential measurement of (i) three replicates of the sample on a single PS-DUS, (ii) three replicates of the enriched tracer deposited on a single paper disc, and (iii) three replicates of the sample + tracer blend on a single PS-DUS. With both calibration strategies, results for the samples analyzed were obtained as the mean of three determinations carried out on different PS-DUS specimens and acquired on different days.

Safety Concerns. Biological fluids of human origin have to be considered as potentially infectious and should be treated with appropriate care. However, it has to be stressed that handling of dried spots has been acknowledged to reduce infectious hazards for blood and plasma analysis, as some viruses loose infectivity on drying.[23] Risks associated with shipping are also minimal for these specimens, considering that they should be introduced in zip lock bags before submission. Once the samples arrived to the clinical lab, they should be treated following the regular protocol for handling, labeling, storage, and disposal of urine samples, which may vary for different countries.

RESULTS AND DISCUSSION

Urine Deposition on the FPs and Conditions for Ablation. Unlike for the case of capillary DBS, for which bioanalytical agencies/forums of different countries agree to a large extent on the best collection methodology (National Committee for Clinical Laboratory Standards,[24] European Bioanalysis Forum[25]), there is no consensus methodology for DUS collection.

If one tries to mimic the way capillary blood is sampled on FPs, i.e., depositing a small volume of urine on big sized paper cards, urine will spread over a considerably larger area than blood, which will result in a reduced amount of immobilized sample per area unit and will seriously degrade the achievable sensitivity for analysis by LA-ICPMS. As mentioned before, this was the problem faced by Kumtabtim et al.,[20] which they solved using Teflon slides for sample deposition instead of clinical FP, thus reducing the applicability of their method.

The most straightforward way to improve the situation while still using clinical FP would consist of performing repeated cycles of sample deposition/drying in the same spot so that the analyte concentration per area unit would increase. However, and considering that a full drying cycle at room temperature takes at least 4 h, this working protocol is far from fulfilling one of the first goals of the investigation, i.e., ease of implementation in a nonsupervised context.

In this paper, a novel approach much easier to implement was tested. Instead of using big-sized FP cards, urine was blotted onto small precut paper pieces thus limiting the area where the urine is allowed to expand. The maximum urine volume that the sample's surface tension retains on the paper discs deployed was deposited on each of them, corresponding to about 300 μL of urine for the 16 mm diameter paper discs used. This provides the highest possible sample concentration in the DUS specimens after a single drying cycle, ≈150 μL urine/cm^2, about 10−12 times higher than the concentration obtained for the urine deposited on big-sized paper cards as visually illustrated in Figure 1. This in turn results in much

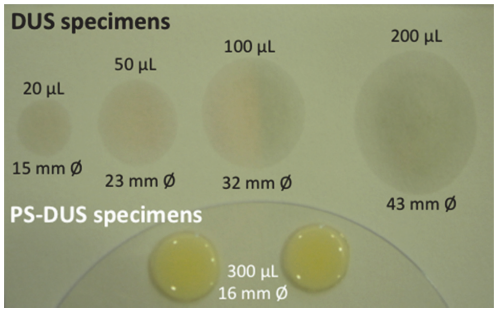


Figure 1. Visual comparison of the sample concentration per area unit achieved when using DUS (above) and PS-DUS specimens (below), respectively. The DUS specimens were obtained by directly blotting the corresponding volumes of urine onto a Whatman 903 FP card with a micropipet. The PS-DUS specimens were obtained by blotting 300 μL of urine onto precut FP discs (16 mm diameter), placed over a hydrophobic surface (a Polycarbonate disc in the figure).

enhanced sensitivities for the LA-ICPMS analysis as discussed later in this section. Application of this collection methodology (referred to as precut saturated (PS)-DUS from now on) would only imply the necessity of depositing the appropriate volume of urine on the FP, which does not pose excessive problems (even for unsupervised contexts) considering that disposable Pasteur pipettes dispensing small volumes are readily available on the market at a reduced cost.

The PS-DUS methodology is also at an advantage when compared to alternative working methodologies published in the literature where precut FP pieces are completely soaked through with urine (by immersing the paper in an appropriate vessel filled with the liquid sample), and the average absorption capacity of the FP and the paper area used for analysis are relied upon for reporting the final analytical results as concentrations in the liquid urine.[7,10,26] When tested in our lab, the soaking methodology provided concentration values about half the values achieved with the PS-DUS protocol, while rendering higher variability in the volumes retained by the FP.

dx.doi.org/10.1021/ac3018839 | Anal. Chem. 2012, 84, 8682−8690

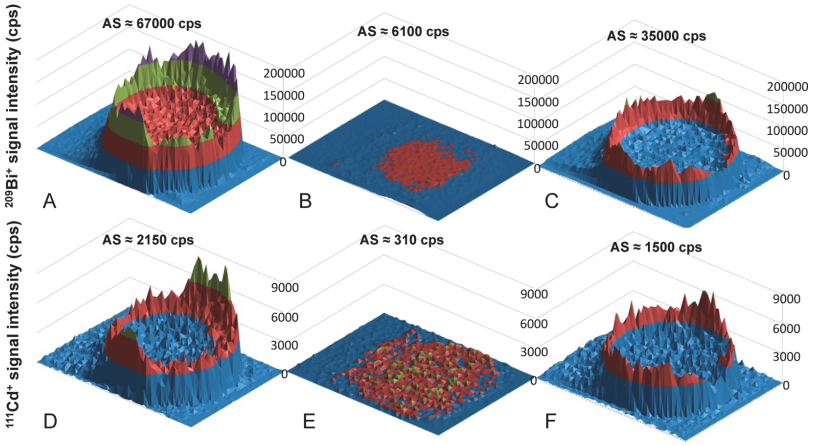


Figure 2. Elemental distribution maps for Bi (A,B,C) and Cd (D,E,F) in (A,D) 16 mm diameter PS-DUS specimen obtained from a urine sample doped to a final concentration of 100 μg L^{-1} for both analytes; (B,E) 25 μL DUS specimen occupying approximately the same area and obtained from the same urine sample; (C,F) PS-DSS obtained from a multielemental standard solution containing 100 μg L^{-1} of both analytes. Approximated average signals (AS) obtained for an area of 9 mm × 9 mm in the center of the precut spots are indicated in the figure for comparison of sensitivities. ICPMS acquisition was performed at medium mass resolution ($R \approx 4000$). Note: The color scale in parts B and E has been altered for improving readability.

Moreover, some additional and very important advantages are derived from the PS-DUS approach if analysis by LA-ICPMS is to be carried out. In fact, one of the main concerns when working with dried spots for any matrix is the more than probable chromatographic separation of the sample components if the sample is allowed to freely migrate on the cellulose support. This feature causes problems if the complete dried spot is not sampled, as would be typically the case for LA-ICPMS. In order to check if the analytes' distribution over the paper surface was homogeneous for the PS-DUS specimens, an elemental map was acquired with the LA-ICPMS setup for a PS-DUS doped with 100 μg L^{-1} of all of the analytes of interest together with Pt, in the same concentration, used as an internal standard. The full PS-DUS area was scanned by ablating adjacent lines with a laser beam diameter of 400 μm and selecting the scanning parameters (ICPMS acquisition times and sample translation speed) so as to provide square pixels in the final elemental map.[27] For this particular experiment, ICPMS acquisition was performed in medium resolution mode ($R \approx 4000$) to monitor all the elements of interest simultaneously.

Figure 2A,D, where spatial distribution of Bi and Cd, respectively, over the FP are shown, illustrates the typical behavior observed for all of the elements studied. In all instances, analyte concentration seems to be higher on the PS-DUS rim, but there is a large central area where the analyte distribution is rather homogeneous. This is further demonstrated in Figure 3, which displays the relative standard deviation (RSD) values calculated for the averaged signal intensities of 22 scan lines covering an area of 9 mm × 9 mm in the center of the PS-DUS and for all of the analytes considered in the work. As seen in the figure, the RSD calculated was below 10% in all cases, mostly in the range of 5−6%. These values were significantly improved for most analytes when the Pt signal was used as an internal standard to correct for different ablation efficiencies and sensitivity drifts. As seen in

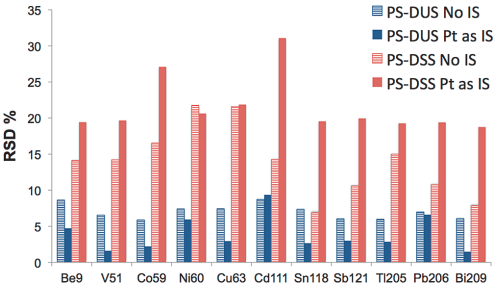


Figure 3. Relative standard deviation (RSD) values (%) calculated for the averaged signal intensities of 22 scan lines covering an area of 9 mm × 9 mm in the center of the precut discs shown in Figure 2 (PS-DUS obtained from a urine sample doped to a final concentration of 100 μg L^{-1} for all analytes; PS-DSS obtained from a multielemental standard solution containing 100 μg L^{-1} of all analytes) with and without the use of $^{195}Pt^{+}$ signal as internal standard (IS). ICPMS acquisition was performed in medium resolution mode ($R \approx 4000$).

the figure, use of Pt reduced the RSDs down to a level of 2−3%, which is difficult to further improve for LA-ICPMS as a result of the irreproducible nature of the ablation process.[28] These results prove that the influence of the existing chromatographic effects on the quantitative results is practically eliminated as long as sample ablation is carried out in the middle of the PS-DUS disc.

Conversely, the situation is rather different when the urine is allowed to freely migrate on big paper cards. Figure 2B,E shows the spatial distribution of Bi and Cd, respectively, on a FP card on which 25 μL of the same urine sample used for obtaining Figure 2A,D were blotted (occupying approximately the same area as the PS-DUS displayed in Figure 2A,D) and obtained with the same acquisition parameters. Two important

dx.doi.org/10.1021/ac3018839 | Anal. Chem. 2012, 84, 8682−8690

conclusions, which can be extended to all analytes studied, are apparent from these figures. (i) Analyte distribution is different for the different analytes. In these particular cases, for instance, Bi accumulates in the center of the spot while Cd shows a more homogeneous distribution over the spot surface. (ii) Sensitivity per area unit measured in the center of the spot is 8−11 times lower than for the PS-DUS discs, depending on the element considered (lower enhancements are apparent for elements such as Cd for which signals for the DUS specimen are closer to the limit of detection (LOD)). These facts further support the superiority of the PS-DUS approach as sample collection system.

As a result of all of the above, the PS-DUS sample collection methodology was adopted in this work for further studies. As for the ablation strategy used for obtaining quantitative results, ablation was always performed inside the 9 mm × 9 mm area in the center of the precut paper discs where homogeneity can be assured. On the other hand, it seems that most analytes accumulate on the FP surface (see the Supporting Information, Figure S-1), which results in better sensitivities (10−20 times higher, depending on the analyte) when lines are ablated along the surface of the paper at a fast translation speed penetrating about 20 μm in depth only (raster mode) instead of ablation at a single spot (drill mode), which had to be carried out at a slower pace (5 Hz) in order to obtain a signal of similar duration without piercing the FP (400−500 μm thick). Ablation of lines also allows overcoming inhomogeneity in the PS-DUS specimens.[29] Consequently, data for every sample/standard were acquired by averaging the signals obtained for 3 lines ablated on the center of each PS-DUS specimen.

Calibration Strategies. Calibration is one of the most critical points in LA-ICPMS analysis[30,31] and was carefully considered in this work. First, the most straightforward possibility was tested: external calibration against precut filter discs doped with multielement aqueous standard solutions (PS-DSS) with known concentrations. The experiments carried out in our lab revealed very different analyte responses for the ablation of the discs doped with the multielement aqueous standards and the PS-DUS. First, a significant signal intensity enhancement was observed for all of the analytes in the PS-DUS specimens, as shown in Figure 2A,C for Bi and Figure 2D,F for Cd. Moreover, a more heterogeneous distribution of a single analyte over the paper surface, as well as different distribution patterns for different elements, was seen for the discs doped with multielement standard solutions. These two effects are illustrated in Figure 3, which shows the RSD values calculated for a precut disc doped with a 100 μg L^{-1} multielement aqueous solution. In contrast to what was observed for the PS-DUS specimens, the RSD values obtained in this case are rather different among the different elements and, on average, higher than those observed in the first case. When using Pt as an internal standard on the other hand, RSD values get worse for most of the elements, revealing a different distribution pattern for the analytes of interest and the internal standard over the paper disc. As a result of all of the above, external calibration with aqueous standards provided unsatisfactory results.

In order to overcome these matrix effects, use of matrix-matched calibration curves was considered next. This possibility, which is in principle the ideal solution for quantitative approaches, is not difficult to implement in this particular case, as it is simple for a clinical lab to obtain urine samples from healthy patients with normal trace element contents and spike them with appropriate concentrations for the analytes of interest (or else to acquire commercially available urine standards). Preparation of these matrix-matched calibration standards is described in the section Preparation of Samples and Standards.

At this point, addition and use of an internal standard (IS) was considered. When working with LA-ICPMS for quantitative purposes, use of internal standardization for correcting for different ablation efficiencies or sensitivity drifts is highly recommended.[32] This is especially interesting when the experimental setup obliges to open and close the ablation chamber in order to load the samples/standards in the middle of a measurement.[33] For this purpose, an element present in all samples and standards with the same spatial distribution needs to be used. One frequent option is to select a major matrix component. For instance, carbon is a possibility for biological applications,[32] but its content cannot be assumed to be constant for all urine samples (and, thus, it should be determined beforehand) and its behavior as an IS remains controversial, since it has been demonstrated that, in contrast to most analytes, ablated carbon is transported in two different phases.[34]

An alternative working strategy would consist of adding an appropriate IS, originally absent in the samples or present at very low concentration levels only, to all the calibration standards and samples. The challenge at this point is finding a way for spiking samples and standards with the IS but without compromising the inherent advantages of DUS sample collection.

In this regard, three different approaches for IS application are available:[35] (1) IS added to the urine matrix before spotting onto paper, (2) use of paper discs pretreated with IS, and (3) IS applied to the DUS specimen in the lab before analysis. Self-evidently, option 1 would be preferred from an analytical point of view, as it ensures that the IS is fully incorporated in the sample matrix together with the analyte before deposition on the FP. However, this possibility is not compatible with simple DUS collection in an unsupervised context and needs to be carried out in the lab. Use of paper filters pretreated with the IS circumvents this difficulty but would complicate logistics and cost, especially when multiple studies, study centers, and/or compounds are to be targeted. Option 3 is the only one keeping the DUS advantages intact, and therefore, it was further investigated.

Application of the IS over the DUS specimens once they have been sent to the analytical lab can be carried out in different ways. In a work dealing with quantification of two pharmaceutical compounds in DBS by means of liquid chromatography−MS/MS after extraction, the IS was applied onto the DBS by using a piezoelectric spray system.[35] In this work, a similar but less sophisticated IS application methodology using calibrated micropipets available at any analytical lab was tested. As described in the section Preparation of Samples and Standards, sample and standard PS-DUS specimens were spiked with a 100 μg L^{-1} Pt standard solution by blotting 300 μL over the previously dried 16 mm discs containing the sample/standard. For validating this working methodology, results obtained for the analysis of a certified reference material (Clincheck Urine Control Level II) upon implementation of this postsampling IS application methodology were compared with results obtained for the same sample but when the IS was added to the liquid samples/standards before deposition (option 1 in the list above). Both determinations were carried

Table 2. Results for the Analysis of Clincheck Urine Control Level II with the Different Calibration Methodologies Tested[a]

	matrix-matched calibration curve		isotope dilution		
analyte	IS added to liquid urine	IS added to dried PS-DUS	tracer added to liquid urine	tracer added to dried PS-DUS	reference value
Be	13.1 ± 2.9	12.4 ± 3.0			10.0[b]
Bi	10.5 ± 1.6	9.6 ± 1.8			10.0[b]
Cd	16.3 ± 2.9	13.5 ± 2.4	14.7 ± 2.9	18.6 ± 3.3	15.0 ± 3.0
Co	33.5 ± 3.2	41.6 ± 7.3			34.5 ± 5.9
Cu	125 ± 18	133 ± 29	118 ± 36	120 ± 33	118 ± 23.6
Ni	37.9 ± 4.9	35.7 ± 5.8			44 ± 11
Pb	68.1 ± 8.3	72.5 ± 9.5	65.0 ± 10.2	62.7 ± 8.6	64.5 ± 16.1
Sb	39.1 ± 10.0	49.2 ± 13			45.9 ± 9.8
Sn	12.0 ± 3.3	10.3 ± 1.4			9.43 ± 1.9
Tl	15.5 ± 4.9	17.7 ± 4.8			18.8 ± 3.8
V	48.2 ± 2.9	55.3 ± 5.4			48.4 ± 9.7

[a]All results are expressed in $\mu g\ L^{-1}$ (discussion on normalization possibilities are included in the Supporting Information). Except for the reference values, uncertainties are reported as 95% confidence intervals ($n = 3$). [b]Be and Bi are absent in the reference sample and were spiked after sample reconstitution following the protocol described in the section Preparation of Samples and Standards.

out using the experimental protocol described in the section Instrumentation and Signal Acquisition Protocol for Quantitative Analysis of Dried Urine Spots by Means of LA-ICPMS. Satisfactory calibration curves were obtained in both cases for all analytes when signals were normalized to the signal obtained for $^{195}Pt^{+}$, showing good linearities ($R^2 \geq 0.99$) in the concentration range of interest (5−500 $\mu g\ L^{-1}$). Results obtained for the analyses are gathered in Table 2.

As seen from this table, matrix effects seem to be overcome with this working methodology, as results obtained for the Clincheck sample are in good agreement with the reference values with both IS deposition strategies. This proves the utility of postsampling IS addition, a working protocol allowing collection of samples in an unsupervised way with later analysis at referral centers, where the most appropriate IS can be freely selected by the analyst. Among other advantages, this approach seems optimum for archiving samples in biobanks, as it preserves sample utility for a larger number of studies (e.g., determination of analytes interfered by the IS selected).

The possibility of using isotope dilution for calibration with the same postsampling tracer addition scheme was also investigated for some elements for which enriched spikes were available at our lab. In particular, determination of Cd, Cu, and Pb in the Clincheck reference sample was attempted. In this case, the post sampling tracer addition scheme was used for preparing the sample + tracer PS-DUS specimens, as described in the section Preparation of Samples and Standards, and results for the analysis were compared with those obtained after adding the enriched tracer directly to the liquid samples/standards (see Table 2). The results obtained for ID calibration with both spiking protocols are similar and in good agreement with the reference values, indicating that sample-tracer equilibrium seems to be achieved when using this postsampling tracer addition protocol and enabling the use of this calibration methodology at the analyst's will. Even though use of ID is not free from inconveniences (e.g., restricted multielement capabilities or necessity for carefully selecting the amount of enriched tracer added to the sample), results for this calibration strategy have been traditionally acknowledged for being highly reliable, even when temporal or matrix-induced changes in sensitivity occur.[36] In our case, however, uncertainty budgets for both external calibration approaches and ID are comparable, suggesting that the main sources of uncertainty are not overcome with the use of this calibration protocol.

In fact, a closer look to all results included in Table 2 reveals a relatively high dispersion for the results obtained with the different calibration approaches, even if they are fit-for-purpose in the clinical survey context.[37] These large uncertainties are most probably explained by the inherent expected variability for the PS-DUS specimens derived from the preparation protocol deployed, and this has to be accounted as one of the method's limitations. At the low concentration level, however, some improvements could be expected if a better control of the sources of contamination in the FPs was implemented. According to previous conclusions drawn using DBS,[38,39] variable (both within and between lots) and relatively high blank contributions can be expected for the type of paper filter used in our work, which is originally designed for DBS collection and is printed in one side for patient identification and sample positioning. Ablation of the printed areas revealed significant presence of the different analytes in the ink deployed (especially Co, Cu, Sn, and Ni), which will certainly result in significant levels of contamination in the FPs, even if sample deposition is performed in ink-free areas and papers from the same lot were used throughout the study. Our analytical methodology is based on the assumption that every FP used contributes to the same extent to the blank level for every analyte, and hence, no blank subtraction needs to be performed at any point of the analytical method. If blank contributions from the FPs vary, this would certainly cause larger uncertainties when elements at very low concentration levels are targeted. Additional studies are, however, needed to fully evaluate the impact that the use of cleaner FPs would have on the final results.

Analysis of Real Samples and Limits of Detection. To further prove applicability of the method for real urine samples, two samples from healthy patients for which reference values had been obtained by means of PN-ICPMS were spiked with 20 $\mu g\ L^{-1}$ of every analyte and were analyzed following the optimized protocol: external calibration with matrix-matched PS-DUS specimens and application of the IS in the lab. Satisfactory recoveries within the range ±15% of the expected value[37] were obtained in both samples for all of the analytes (see the Supporting Information, Table S-1).

The limits of detection for this working methodology were calculated with the $3S_{blank}$ definition. S_{blank} was estimated from 10 replicate measurements made in three different precut blank FPs. Results, expressed as liquid urine concentration, are

dx.doi.org/10.1021/ac3018839 | Anal. Chem. 2012, 84, 8682−8690

Table 3. Limits of Detection for the Optimized Analytical Method (External Calibration with Matrix-Matched Standards and Addition of the IS in the Lab onto the PS-DUS Specimen) Relative to Liquid Urine Concentration

	Be	Bi	Cd	Co	Cu	Ni	Sb	Sn	Tl	Pb	V
LOD ($\mu g\ L^{-1}$)	0.1	0.3	0.5	0.2	13	10	1	0.5	0.1	1	1

gathered in Table 3. As shown in this table, LODs are $\leq 1\ \mu g\ L^{-1}$ for most of the analytes targeted, but higher LOD values were obtained for Cu or Ni, probably due to the variable blank contribution of the printed FPs, as discussed in the section Calibration Strategies. It seems clear from these data that a better control of the sources of contamination, especially the ink used for printing the FPs, should be implemented, as this seems to be the major limiting factor for ensuring the best performance for this analytical method in the low concentration range. It is important to stress at this point that the PS-DUS specimens were manipulated without taking special precautions for cleanliness, as the main purpose of the work was potential implementation of the method in unsupervised contexts. A deeper study on how real collection in unsupervised contexts would affect the method performance is obviously needed before further conclusions can be drawn.

CONCLUSIONS

For the first time, a general methodology for the direct determination of trace elements at the $\mu g\ L^{-1}$ level in urine samples deposited on clinical FPs by means of LA-ICPMS is provided. Use of a novel sampling approach based on precut FP discs capable of retaining large amounts of urine is crucial for achieving sufficient sensitivity for the analysis. Moreover, this sampling methodology permits addition of an adequate internal standard at the clinical lab right before analysis, making it compatible with unsupervised sample collection and preservation of the unmodified sample for potential use in additional studies.

The method developed proved suitable in terms of accuracy and LODs, with precision that is fit-for-purpose, although some improvements can be expected if a better control of the sources of contamination in the FP is implemented. Other improvement worth exploring in the future could be the coupling of high repetition rate femtosecond laser sources. This kind of laser instrument allows the ablation of significantly higher sample amounts thus enhancing the method sensitivity,[40] which could open the possibility for using more robust and accessible quadrupole ICPMS instrumentation. In any case, it seems clear that the proposed methodology presents promising possibilities in various contexts where sample collection far from the clinical lab is advantageous, such as large population studies involving participation of volunteers, following of chronic patients, or sampling in under-developed areas lacking the technical resources for regular urine analysis.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Additional material as described in the text. This material is available free of charge via the Internet at http://pubs.acs.org.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Author

*E-mail: mresano@unizar.es.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank the Spanish Ministry of Science and Innovation (Project CTQ2009-08606) and the Government of Aragón (Departamento de Ciencia, Tecnología y Universidad del Gobierno de Aragón y Fondo Social Europeo) for the funding. M.A. acknowledges the FWO-Vlaanderen for her postdoctoral grant.

REFERENCES

(1) Guthrie, R.; Susi, A. *Pediatrics* **1963**, *32*, 338−343.
(2) Pitt, J. J. *Clin. Biochem. Rev.* **2010**, *31*, 57−68.
(3) Edelbroek, P. M.; van der Heijden, J.; Stolk, L. M. L. *Ther. Drug Monit.* **2009**, *31*, 327−336.
(4) Beaudette, P.; Bateman, K. P. *J. Chromatogr., B: Anal. Technol. Biomed. Life Sci.* **2004**, *809*, 153−158.
(5) Stove, C. P.; Ingels, A.-S. M. E.; De Kesel, P. M. M.; Lambert, W. E. *Crit. Rev. Toxicol.* **2012**, *42*, 230−243.
(6) Resano, M.; Rello, L.; Garcia-Ruiz, E.; Belarra, M. A. *J. Anal. At. Spectrom.* **2007**, *22*, 1250−1259.
(7) Inoue, Y.; Ohse, M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *400*, 1953−1958.
(8) Rago, B.; Liu, J.; Tan, B.; Holliman, C. *J. Pharm. Biomed. Anal.* **2011**, *55*, 1201−1207.
(9) Kinoshita, Y.; Yamada, S.; Haraguchi, K.; Takayanagi, T.; Mori, Y.; Takahashi, T.; Haruki, E. *Clin. Chem.* **1988**, *34*, 2228−2230.
(10) Auray-Blais, C.; Cyr, D.; Drouin, R. *J. Inherit. Metab. Dis.* **2007**, *30*, 515−521.
(11) Abu-Rabie, P. *Bioanalysis* **2011**, *3*, 1675−1678.
(12) McDade, T. W.; Williams, S.; Snodgrass, J. J. *Demography* **2007**, *44*, 899−925.
(13) Rockett, J. C.; Buck, G. M.; Lynch, C. D.; Perreault, S. D. *Environ. Health Perspect.* **2003**, *112*, 94−104.
(14) Sarmiento-González, A.; Marchante-Gayón, J. M.; Tejerina-Lobo, J. M.; Paz-Jiménez, J.; Sanz-Medel, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2008**, *391*, 2583−2589.
(15) Gonçalves Magalhaes, C.; Rolla Nunes, B.; Oss Giacomelli, M. B.; Borba da Silva, J. B. *J. Anal. At. Spectrom.* **2003**, *18*, 787−789.
(16) Miekeley, N.; Mortari, S. R.; Schubach, A. O. *Fresenius J. Anal. Chem.* **2002**, *372*, 495−502.
(17) Ala, A.; Walker, A. P.; Ashkan, K.; Dooley, J. S.; Schilsky, M. L. *Lancet* **2007**, *369*, 397−408.
(18) Cizdziel, J. V. *Anal. Bioanal. Chem.* **2007**, *388*, 603−611.
(19) Elliott, P.; Peakman, T. C. *Int. J. Epidemiol.* **2008**, *37*, 234−244.
(20) Kumtabtim, U.; Siripinyanond, A.; Auray-Blais, C.; Ntwari, A.; Becker, J. S. *Int. J. Mass Spectrom.* **2011**, *307*, 174−181.
(21) Pisonero, J.; Fernández, B.; Günther, D. *J. Anal. At. Spectrom.* **2009**, *24*, 1145−1160.
(22) Mei, J. V.; Zobel, S. D.; Hall, E. M.; De Jesús, V. R.; Adam, B. W.; Hannon, W. H. *Bioanalysis* **2010**, *2*, 1397−1403.
(23) Parker, S. P.; Cubitt, W. D. *J. Clin. Pathol.* **1999**, *52*, 633−639.
(24) Hannon, W. H.; Baily, C. M.; Bartoshesky, L. E.; Davin, B.; Hoffman, G. L.; King, P. P.; Neier, S. S.; Peter, J. A.; Therrell, B. L. *Blood Collection on Filter Paper for Newborn Screening Programs*, Approved Standard-4th ed., NCCLS document LA4-A4, Pennsylvania, United States, 2003.
(25) Timmerman, P.; White, S.; Globig, S.; Lüdtke, S.; Brunet, L.; Smeraglia, J. *Bioanalysis* **2011**, *3*, 1567−1575.
(26) Blasco, H.; Garrigue, M.-A.; Vos, A.; Antar, C.; Labarthe, F.; Maillot, F.; Andres, C. R.; Nadal-Desbarats, L. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, *396*, 1205−1211.
(27) Triglav, J.; van Elteren, J. T.; Šelih, V. S. *Anal. Chem.* **2010**, *82*, 8153−8160.

(28) Aramendía, M.; Resano, M.; Vanhaecke, F. *J. Anal. At. Spectrom.* **2010**, *25*, 390−404.
(29) Resano, M.; García-Ruiz, E.; McIntosh, K. S.; Vanhaecke, F. *J. Anal. At. Spectrom.* **2008**, *23*, 1599−1609.
(30) Fernández, B.; Claverie, F.; Pécheyran, C.; Alexis, J.; Donard, O. F. X. *Anal. Chem.* **2008**, *80*, 6981−6994.
(31) Resano, M.; García-Ruiz, E.; Vanhaecke, F. *Mass Spectrom. Rev.* **2010**, *29*, 55−78.
(32) Hare, D.; Austin, C.; Doble, P. *Analyst* **2012**, *137*, 1527−1537.
(33) Resano, M.; McIntosh, K. S.; Vanhaecke, F. *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, *27*, 165−173.
(34) Frick, D. A.; Günther, D. *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, *27*, 1294−1303.
(35) Abu-Rabie, P.; Denniff, P.; Spooner, N.; Brynjolffssen, J.; Galluzzo, P.; Sanders, G. *Anal. Chem.* **2011**, *83*, 8779−8786.
(36) Rodríguez-González, P.; Marchante-Gayón, J. M.; García Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. *Spectrochim. Acta, Part B: At. Spectrosc.* **2005**, *60*, 151−207.
(37) Levine, K. E.; Tudan, C.; Grohse, P. M.; Weber, F. X.; Levine, M. A.; Kim, Y.-S. J. *Bioanalysis* **2011**, *3*, 1699−1712.
(38) Chaudhuri, S. N.; Butala, S. J. M.; Ball, R. W.; Braniff, C. T.; Biomonitoring, R. M. *J. Exposure Sci. Environ. Epidemiol.* **2008**, *19*, 298−316.
(39) Langer, E. K.; Johnson, K. J.; Shafer, M. M.; Gorski, P.; Overdier, J.; Musselman, J.; Ross, J. A. *J. Exposure Sci. Environ. Epidemiol.* **2011**, *21*, 355−364.
(40) Fernández, B.; Claverie, F.; Pécheyran, C.; Donard, O. F. X. *TrAC, Trends Anal. Chem.* **2007**, *26*, 951−966.

Supporting Information

Direct trace-elemental analysis of urine samples by laser ablation - inductively coupled plasma - mass spectrometry after sample deposition on clinical filter papers

Maite Aramendía[a], Luis Rello[b,c], Frank Vanhaecke[d], Martín Resano[c]*

[a]Centro Universitario de la Defensa-Academia General Militar de Zaragoza, Carretera de Huesca s/n, 50090, Zaragoza, Spain.

[b]Department of Clinical Biochemistry, "Miguel Servet" Universitary Hospital, Paseo Isabel La Católica 1-3, 50009 Zaragoza, Spain.

[c]Department of Analytical Chemistry, University of Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, 50009 Zaragoza, Spain.

[d]Department of Analytical Chemistry, Ghent University, Krijgslaan 281-S12, 9000 Ghent, Belgium.

Corresponding author: E-mail address: mresano@unizar.es; Phone number: +34 976761634; Fax number: +34 976761292

Contents

Experimental details

Table S-1

Figure S-1

Experimental details

Preparation of the tracer solution used for ID experiments

A stock multi-element tracer solution enriched in ^{111}Cd, ^{65}Cu and ^{206}Pb was prepared by mixing 10 µL of 1 g L^{-1} ^{nat}Cd, 40 µL of 1 g L^{-1} ^{nat}Cu, 20 µL of 1 g L^{-1} ^{nat}Pb, 1 mL of ≈4 mg L^{-1} ^{111}Cd-enriched solution, 5 mL of ≈2.5 mg L^{-1} ^{65}Cu-enriched solution, 15 µL of ≈2 g L^{-1} ^{206}Pb-enriched solution and subsequent addition of 0.14 M HNO_3 to obtain a final volume of 10 mL. The exact isotopic composition for this solution, further referred to as the stock multi-element tracer solution, was determined by reverse isotope dilution with PN-SF-ICP-MS and was found to be 1.13 µmol L^{-1} ^{113}Cd, 4.86 µmol L^{-1} ^{111}Cd, 38.8 µmol L^{-1} ^{65}Cu, 45.3 µmol L^{-1} ^{63}Cu, 5.92 µmol L^{-1} ^{208}Pb and 19.5 µmol L^{-1} ^{206}Pb.

Possibilities for normalization of urine concentration

Creatinine normalization is largely used in clinical labs for expressing urine composition results for different types of analytes, correcting for urine dilution effects. However, direct creatinine determination on the DUS specimens has not been described in the literature yet, and it is currently only possible after sample extraction with an adequate solvent. In any case, the use of creatinine normalization for trace element quantification is not so widely accepted, as it has been shown that it may produce biased results for some elements, such as Hg or Pb, because the mechanism of excretion of these elements is different from that of creatinine.[1] Alternatively, there are other methods currently in use for controlling urine dilution without the necessity for measuring creatinine, such as collection of the first urine of the morning or 24h urine collection,[2] both of which could be easily implemented with the methodology proposed in this work.

References

(1) Boeniger, M. F.; Lowry, L. K.; Rosenberg, J. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* **1993**, *54*, 615–627.

(2) Huang, L.; Yu, X.; Zhang, J.; Liu, X.; Zhang, Y.; Jiao, X.; Yu, X. *Biol. Trace Elem. Res.* **2012**, *146*, 154–159.

+ +

Table S-1. Results for the analysis of two real urine samples characterized by means of PN-SF-ICP-MS and spiked with 20 µg L^{-1} of every analyte, expressed as recovery percentage from the expected value.

% Recovery	Be	Bi	Cd	Co	Cu	Ni	Sb	Sn	Tl	Pb	V
Sample 1	103	101	93	89	102	110	102	91	94	104	98
Sample 2	110	95	101	98	96	104	88	106	95	111	93

+
+ +

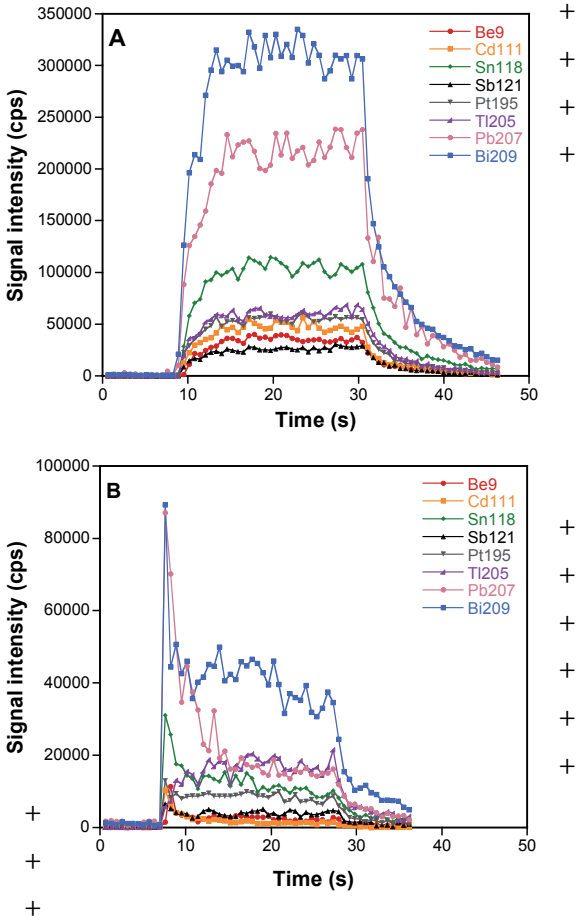


Figure S-1. LA-ICP-MS signals obtained upon ablation of a PS-DUS specimen (urine doped with 50 µg L^{-1} of all of the analytes of interest) in (A) raster mode: 400 µm spot size diameter, 400 µm s^{-1} translation speed, 20Hz repetition rate; and (B) drilling mode: 400 µm spot size, 5Hz repetition rate. ICP-MS acquisition was performed in Low Resolution mode (R≈300).

Spectrochimica Acta Part B 81 (2013) 11–19

Contents lists available at SciVerse ScienceDirect

Spectrochimica Acta Part B

journal homepage: www.elsevier.com/locate/sab

A dried urine spot test to simultaneously monitor Mo and Ti levels using solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry

L. Rello [a,b], A.C. Lapeña [a], M. Aramendía [c], M.A. Belarra [a], M. Resano [a,*]

[a] Department of Analytical Chemistry, University of Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, 50009, Zaragoza, Spain
[b] Department of Clinical Biochemistry, "Miguel Servet" Universitary Hospital, Paseo Isabel La Católica 1-3, 50009, Zaragoza, Spain
[c] Centro Universitario de la Defensa-Academia General Militar de Zaragoza, Carretera de Huesca s/n, 50090, Zaragoza, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 20 September 2012
Accepted 12 December 2012
Available online 21 December 2012

Keywords:
Solid sampling
High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry
Dried urine spot
Metallic prosthesis

ABSTRACT

Home-based collection protocols for clinical specimens are actively pursued as a means of improving life quality of patients that require frequent controls, such as patients with metallic prosthesis, for whom monitoring the evolution of Mo and Ti in biological fluids may play a decisive role to detect prosthesis mal-functioning. The collection of biological fluids on clinical filter papers provides a simple way to implement these protocols.
This work explores the potential of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous and direct determination of Mo and Ti in urine, after its deposition onto clinical filter paper, giving rise to a dried urine spot. The approach used for depositing the sample was found crucial to develop a quantitative method, since the filter paper acts as a chromatographic support and produces a differential distribution of the target analytes. Furthermore, the high spreading of urine onto a filter paper results in a small amount of urine per surface unit, and thus, ultimately, in lack of sensitivity. In order to circumvent these problems, the use of an alternative approach based on the use of pre-cut 17×19 mm filter paper pieces onto which larger amounts of sample (500 μL) can be retained by single deposition was proposed and evaluated. In this way, an approximately 12-fold increase in sensitivity and a more homogeneous distribution of the target analytes were obtained, permitting the development of a quantification strategy based on the use of matrix-matched urine samples of known analyte concentrations, which were subjected to the same procedure as the samples. Accuracy of this method, which provides LODs of 1.5 μg L^{-1} for Mo and 6.5 μg L^{-1} for Ti, was demonstrated after analysis of urine reference materials. Overall, the performance of the method developed is promising, being likely suitable for determination of other analytes in dried urine spots.

© 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Ti has no known biological role in humans and it has long been considered as biologically inert and, therefore, it seems ideal for metallic implants, such as dental and orthopedic replacements (joint, hip or spinal implants, to name a few) [1]. Ti quantification in biological fluids could have been considered as anecdotic until a few years ago, as its measurement did not have any clear clinical interest.

On the other hand, Mo is an essential trace element for plants, animals and microorganisms. Up to date, Mo is considered as practically non-toxic to humans, albeit patients with acute Mo poisoning exhibit symptoms similar to those of Cu deficiency or abnormal sulfur metabolism. Therefore, as discussed before for Ti, Mo has not been normally monitored in clinical samples. Furthermore, these elements, and in particular Ti, are not easy to quantify at basal levels by graphite furnace atomic absorption spectrometry (GFAAS) and or by quadrupole-based inductively coupled plasma-mass spectrometry (Q-ICP-MS) [1].

However, the situation has changed as a consequence of the use of metallic implants in joint-replacement surgery, since the concentration of some metals in blood and/or urine has been considered as potential indicator of implant performance. These implants are made with alloys typically containing Cr, Co, Mo and/or Ti. Thus, the monitoring of these analytes in a variety of clinical specimens, such as serum, urine, whole blood, erythrocytes and joint fluid, has become of great interest [2].

A number of investigations have shown that these elements modestly raise its concentration in these matrices after the implant, but then they reach a plateau when the prosthesis is well functioning [3–6]. Most importantly, it has been demonstrated that a notable increase in the concentration of these metals may occur in mal-functioning prostheses, including examples where it was not possible to visualize this fail (abnormal wear, corrosion or displacement of the implant) by diagnostic imaging techniques, in spite of the pain referred by the patient. These

* Corresponding author. Tel.: +34 976761634; fax: +34 976761290.
E-mail address: mresano@unizar.es (M. Resano).

0584-8547/$ – see front matter © 2012 Elsevier B.V. All rights reserved.
http://dx.doi.org/10.1016/j.sab.2012.12.001

abnormal metal concentrations proved to be evidence of several kinds of unstable prostheses, which had to be replaced surgically [6–9]. As a consequence of these cases, increasing attention is paid to the monitoring of these metallic elements in clinical samples [10].

On the other hand, there is a growing interest in the deposition of biological fluids, such as blood [11] or urine [12], on filter papers (FP), giving rise to what is generically called dried matrix spots (DMS). This sampling methodology offers significant advantages in terms of logistics for clinical analysis. In the case of urine, this is certainly not a particularly difficult fluid to collect. However, many urinary metabolites have a poor stability, thus requiring restrictive precautions, especially for sample transport and storage. Therefore, the deposition of urine on clinical filter paper (giving rise to dried urine spots, DUS) becomes an attractive alternative due to the ease of preservation [13]. Furthermore, DUS samples can be easily mailed over distances, even overseas, for analysis at referral centers. This aspect is very interesting in various clinical contexts, such as carrying out large-population based studies [14], or monitoring of chronic patients or patients that have undergone a certain type of surgery (e.g., patients with implants). DUS specimens should be easily prepared at home by the own patients, helping to reduce their number of visits to the clinic, and improving their life quality. As a result, any efforts to develop analytical methods based on DUS samples for as many analytes as possible are regarded with interest in the clinical field.

There are several examples in the literature dealing with the analysis of dried urine on clinical filter paper, but the majority are focused on detection of metabolites and drugs [15]. Very little work has been carried out aiming at elemental monitoring, on DUS [16,17] (using laser ablation–inductively coupled plasma–mass spectrometry, LA–ICP–MS), or in general on DMS [18,19]. One of the reasons for this limited work may be that, even though the use of this technique looks very appealing for implementing home-based collection methods [20], it presents a further problem for analysis: the transformation of a relatively simple liquid sample (urine) into a solid one (DUS), which typically requires additional work (e.g., digestion or extraction of the analytes of interest from the filter paper prior to analysis [21]). Instead, the use of solid sampling techniques allowing for the direct analysis of DMS represents an attractive alternative, increasing sample throughput and minimizing risks of losses/contamination, although quantification is not always simple owing to matrix-effects [16,19,22,23].

The purpose of this work is to develop a fast method for the direct and simultaneous determination of Mo and Ti in DUS samples prepared with standardized clinical filter paper. As discussed before, such method could be useful for monitoring the evolution of patients with prostheses. For this purpose, we are exploring the use of solid sampling high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry (SS HR CS GFAAS). To the best of the author's knowledge, the use of GFAAS has not been evaluated yet for direct analysis of DUS. However, the potential of "classic" line source GFAAS for direct analysis of solid samples [24,25], including determination of Pb in blood deposited in FP [18], is well-established. Moreover, this potential has been significantly enhanced with the arrival of HR CS GFAAS [26–28], which offers improved capabilities for the detection and correction of spectral interferences, as well as for the simultaneous monitoring of several elements under certain conditions [29–31], although developing simultaneous methods, as will be required in this work, is not always straightforward [29]. This aspect, together with the investigation of the distribution of the target elements on the DUS and the development of a suitable calibration approach, will be the main topics investigated in the current work.

2. Experimental

2.1. Instrumentation

The measurements of Mo and Ti in dried urine spots were carried out using a high-resolution continuum source atomic absorption spectrometer, ContrAA 700, commercially available from Analytik Jena AG (Jena, Germany) and equipped with both graphite furnace and flame atomizers. The optical system comprises a xenon short-arc lamp (GLE, Berlin, Germany) operating in "hot-spot" mode as the radiation source, a high-resolution double echelle monochromator (DEMON) and a linear CCD array detector with 588 pixels, 200 of which are used for analytical purposes. More details on this type of instrumentation can be found elsewhere [32].

The HR CS AAS instrument is also equipped with a transversely heated graphite tube atomizer, pyrolytic graphite tubes, and both solid sampling (SSA 600, which incorporates a microbalance with a readability of 1 μg) and liquid sampling automated accessories. Solid samples were introduced using solid sampling graphite platforms.

An automated puncher (Wallac DBS Puncher 1296-071, Perkin Elmer, Waltham, USA) producing 3.2 mm diameter disks was also used.

2.2. Samples and standards

2.2.1. Reagents and standards

Purified water was obtained from a milli-Q system (Millipore, Billerica, USA). Mo, Co, Ti, Pd and Pt solutions were prepared from commercially available 1 g L^{-1} single-standards (Merck, Darmstadt, Germany), by appropriate dilution with 0.14 M HNO_3. 14 M HNO_3 was purchased from Merck.

All material (needles, Eppendorf tubes, propylene tubes) was soaked for two months in 0.14 M HNO_3 before use. No signal for Mo or Ti was obtained in any case, whenever these solutions were measured.

2.2.2. Samples

Real urine samples from healthy volunteers were obtained from the Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza, Spain). Two reference materials – Clincheck® Urine Control Level II (ref. 8848, lot 923) and Seronorm® trace element urine (ref. 201205, lot 0511545) – were used to check the performance of the analytical method developed. These were obtained from Recipe chemicals + Instruments GmbH (Munich, Germany) and Alere (Stockport, UK), respectively. Clincheck® Urine Control Level II is provided as a lyophilized material that, once reconstituted with 10 mL of deionized water, shows a certified concentration of Mo of 109 μg L^{-1} (95% C.I., 87.2–131 μg L^{-1}), but no Ti. Seronorm® trace element urine is also provided in lyophilized form and, when reconstituted with 5 mL of deionized water, it contains 49.3 ± 1.3 μg Mo L^{-1} and 21.0 ± 3.1 μg Ti L^{-1}, with uncertainties expressed as standard deviations. For Ti monitoring, both materials were spiked with Ti (absent in the Clincheck control and near the quantification limit in the Seronorm control) until a final concentration of 100 and 121 μg Ti L^{-1}, respectively, was reached. Small spiking volumes, ensuring a dilution factor lower than 3%, were used to maintain the sample matrix practically unchanged.

DUS samples were prepared by depositing controlled volumes of the target urines on Whatman no. 903 (formerly Schleicher & Schuell 903) filter paper. Whatman no. 903 paper cards (Lot W-102) were obtained from Whatman International Ltd. (Maidstone, Kent, UK) and were printed for dried blood spot analysis at a local distributor. The Whatman no. 903 paper is a Food and Drug Administration (FDA)-registered in vitro Class II medical device, used in virtually all U.S. newborn screening programs, and in most newborn screening programs throughout the world. Since it is a medical device, this paper must be manufactured and tested according to FDA Quality System Regulations and must meet stringent requirements. These critical parameters for newborn screening sample collection, as defined by the Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, formerly NCCLS), are blood absorbency, serum uptake and circle size for a specified volume of blood [33].

Concerning the way in which the urine sample was deposited onto the filter paper, different ways were evaluated in this work. In the

first experiments, accurate volumes of spiked urines were pipetted on large FP cards, so the urine could diffuse freely in the paper matrix, giving rise to the so-called "free-diffused DUS". In other cases, repeated cycles of sample deposition/drying in the same spot were carried out. These specimens were named "free-diffused multi-spotted DUS". However, the preferred method of urine deposition, which was finally used for analysis, was the one called "precut-saturated DUS" (PS-DUS). It consisted of the pipetting of 500 μL of urine on small rectangular pieces of 17 × 19 mm, which were cut from the original FP cards and placed on a hydrophobic surface, such as polycarbonate (PC), thus limiting the area where the urine was allowed to expand (see Section 3.3. for more details). The volume used (500 μL) is the maximum urine volume that is retained for paper pieces of this size due to sample surface tension.

Once air-dried for 4 h, the three kinds of DUS, free-diffused one-spotted, free-diffused multi-spotted and precut-saturated, were punched with an automated puncher to obtain 3.2 mm diameter disks that could be directly introduced into the graphite furnace. These disks were stored in Eppendorf tubes until analysis.

2.2.3. Preparation of matrix-matched standards for calibration

Matrix-matched standards were prepared by addition of small quantities of aqueous solutions containing the analytes of interest to Mo–Ti-free (meaning that the Mo and Ti levels were below the LOD obtained by GFAAS) real urine samples. In this way, matrix-matched standards of the required concentration could be obtained. In all cases, the volume of Mo and Ti solutions added represented less than 10% of the total urine volume, in order to minimize the modification of the matrix composition. In some cases, also known quantities of Co were added, up to concentrations of 30 to 1000 mg L^{-1} in the spiked urine, in order to study the feasibility of using Co as an internal standard.

Afterwards, 500 μL of these standards was applied onto the rectangular pieces of precut-filter paper (described in Section 2.2.2) and processed in the same way as the samples for GFAAS monitoring.

2.3. Procedure for solid sampling analysis by HR CS GFAAS

Samples, consisting in 3.2 mm disks punched out from DUS (3 disks per sample), were directly analyzed without any prior preparation step. Although the solid sampling device used allows for automatic weighing of the samples, weighing of the disks was not considered necessary, as it decreases sample throughput. It was checked that the reproducibility of the disk puncher was high enough. Differences between the weight of the disks were monitored to be ≤4% for blank disks and ≤3% for urine disks (n = 10 in both cases), values too low to significantly affect the usefulness of the method in the context explored herein.

On the other hand, it is important to pipet first the modifier solution, and then place the disk onto it, pressing slightly. In this way, an intimate contact between the disk and the modifier can be attained and, moreover, the position of the disk in the platform is reproducibly fixed. Otherwise, there is a potential risk for the disk to raise (particularly for blank filter papers), which could lead to occlusion of the light beam.

In this case, 10 μL of the modifier solution (Pt, 100 mg L^{-1}) was dispensed onto the platform with a micropipette and, then, the sample disk was placed onto it. Afterwards, the platform containing the sample and the modifier was transferred into the graphite furnace and subsequently subjected to the temperature program. All these operations were fully controlled from the computer, except for the deposition of the modifier and the sample disk onto the platform, which were carried out manually. The operating conditions are summarized in Table 1. After sample atomization, a very small carbonaceous residue remains on the platform. This residue is easily withdrawn with a needle after every measurement. Integrated absorbance (A_{int}) was selected as the measurement mode in all cases. For every line evaluated, the values obtained for three detector pixels (the central pixel plus the adjacent ones, CP ± 1), were summed.

Table 1
Instrumental parameters used in the determination of Mo and Ti in DUS by means of HR CS GFAAS.

Wavelength/nm	319.200 (Ti) and 319.397 (Mo)
Number of detector pixels summed per line	3 (approximately 5.85 pm)
Ar gas flow during atomization/mL min^{-1}	Stop-flow conditions
Chemical modifier	1 μg Pt
Sample mass/mg	3.2 mm ∅ FP disc (≈1.5 mg) from precut-saturated dried urine spots
Temperature program	**Temperature/ramp/hold time**
Drying step	200 °C/5° s^{-1}/30 s
Pyrolysis step	350 °C/10° s^{-1}/20 s
Pyrolysis step	1400 °C/300° s^{-1}/20 s
Autozero step	1400 °C/0° s^{-1}/5 s
Atomization step	2650 °C/1500° s^{-1}/15 s
Cleaning step	2700 °C/500° s^{-1}/4 s

3. Results and discussion

3.1. Initial experiments with liquid samples

As discussed in the introduction, there is now supported evidence that the performance of metallic prosthesis in implanted patients could be assessed by the monitoring of elements commonly used in metallic alloys in blood and/or urine, insomuch that a significant increase in their levels would reflect its release from the implant and, therefore, that the prosthesis is mal-functioning [6]. In this regard, Mo and/or Ti are present in practically all types of metallic implants, so these appear as ideal targets for this purpose [5,8,34]. As the human body eliminates Mo and Ti mainly via the kidneys, urine composition should reflect well the exposition to these elements. Thus, when leaking from a malfunctioning implant, it is expected that values at the hundred of μg L^{-1} in urine are seen for these elements.

Our main objective is, thus, to develop a method that permits the simultaneous determination of Mo and Ti in DUS via HR CS GFAAS, and that is sensitive enough to detect such levels. Considering that both elements are in principle rather refractory, it seems possible to atomize both with the same temperature program. However, due to the low level of these elements in urine and the low volume of urine retained per area of the filter paper, it is compulsory to select a zone of the spectrum where sensitive atomic lines for both elements can be found. This is not always easy because the spectral bandwidth that is simultaneously monitored by the detector of the HR CS AAS is rather narrow (in the UV region, 0.2–0.3 nm only).

To the best of our knowledge, there is no previous literature on the determination of Ti via HR CS GFAAS, while Mo determination in glass filters has been reported recently [35]. Therefore, the sensitivity of different atomic lines was evaluated. Finally, the instrument detector (200 pixels) was centered at 319.270 nm. In that way, a spectral bandwidth ranging from 319.104 to 319.494 nm (1.95 pm per pixel) was covered and it was possible to simultaneously monitor resonance lines for both Ti (line located at 319.200 nm, which is practically as sensitive as the usually recommended Ti line at 364.267 nm) and Mo (line located at 319.397 nm, which shows approx. 60% of the signal intensity found for the most sensitive Mo line at 313.295 nm). Interestingly, in that spectral area two additional atomic lines (located at 319.129 nm and at 319.316 nm) were found and were attributed to Co. These lines exhibit a very low intensity and are not really useful for Co determination (their signal intensity is approximately 0.005% of the signal that can be obtained for Co most sensitive line). However, this opens possibilities to use Co as internal standard. The

position of these lines in the spectral range covered by the detector is shown in Fig. 1A.

Optimization of the temperature program was carried out then. It is already well-known that the target analytes are very refractory, carbide forming elements, thus requiring the use of high atomization temperatures and typically showing signals with long tails and potential carry over issues. This aspect can be mitigated, to some extent, with the use of graphite tubes with transversal heating and the adequate selection of chemical modifiers. In fact, the use of fluorinating agents (e.g., Freon, NH_4F, HF) has been explored by several authors with the purpose of obtaining shorter and better defined signal profiles, increasing the lifetime of the tubes [36,37]. However, losses during pyrolysis at moderate temperatures may occur when using these modifiers, particularly for Mo [38]. It was thus preferred to evaluate the use of some Platinum Group Metals (PGMs) as modifiers, which typically guarantees sufficiently high pyrolysis temperatures to properly remove clinical matrixes. In this regard, the use of Pd [39] or other PGM such as Pt [40] have proved beneficial for Mo determination, improving to some extent the pyrolysis temperature and producing shorter and taller signals, even though the characteristic mass did not change significantly when peak areas were used for quantification.

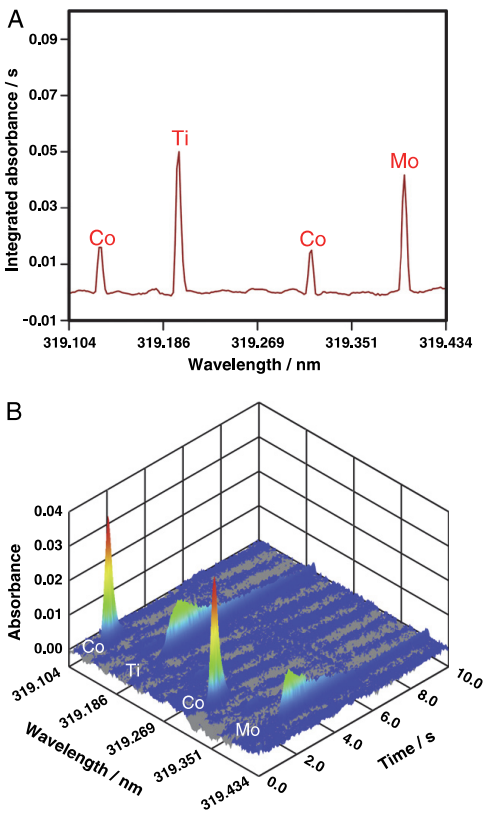


Fig. 1. A) Wavelength resolved time-integrated absorbance spectrum obtained after the vaporization of a spiked urine containing 200 pg of Mo, 1 ng of Ti and 300 ng of Co recorded when monitoring the spectral region centered at 319.200 nm by means of HR CS GFAAS under the conditions described in Table 1. B) Same replicate as in A), showing the time and wavelength-resolved absorbance spectrum.

This aspect was confirmed in the current work. When working with aqueous standards, the use of Pd or Pt leads to shorter signals, increasing the sensitivity only moderately (approx. 20%) while permitting the use of pyrolysis temperatures up to 1600 °C. However, still a very high atomization temperature is needed for maximum sensitivity (2650 °C). The use of a permanent modifier (W and Zr) to protect the lifetime of the tubes was also tested. However, it was observed that this approach resulted in a very significant loss in the signal intensity for Mo (approx. a 10-fold decrease), and was therefore abandoned.

The amount of PGM modifier added needs to be optimized as well. A Pt amount of 0.1 to 1 μg gives maximum sensitivity for both Mo (200 pg) and Ti (1 ng), but the use of an amount of 10 μg or higher leads to a reduction in the sensitivity, particularly for Mo. This point is probably not due to overstabilization issues (the signal does not exhibit more tailing), but to the fact that an increase in Pt also represents an increase in the Cl concentration (needed for stabilization of Pt). This effect has already been documented and it is attributed to the formation of volatile Mo-chloro compounds [40,41]. On the other hand, Pd provides best sensitivity when higher amounts are used (10 μg).

The use of these PGMs proves particularly beneficial when monitoring urine samples. If no modifier was added, no Mo signal was detected at all, which again may be explained considering the high level of Cl present in urine (approx. 1000 mg L^{-1}), while a well-defined signal, very similar to that obtained for aqueous standard solutions, was obtained when adding 0.1–1 μg Pt, or 10 μg Pd. Since Pt seems to be able to solve the interference problem for Mo with lower amounts, it was considered as the most efficient modifier and was used in further work.

Fig. 1B shows the typical signal profiles that can be obtained for urine samples under these working conditions. Mass characteristic values in excellent agreement with values that could be expected for these elements were obtained: 14 pg for Mo and 44 pg for Ti [42].

Finally, as discussed before and shown in Fig. 1, it was possible to simultaneously monitor Co, an element that could act as internal standard (IS), helping in correcting for matrix effects and/or improving the precision, as demonstrated in other situations [29,43]. However, in order to attain these positive effects in GFAAS it is important that the IS and the analyte(s) are vaporized and atomized simultaneously, thus enduring the exact same conditions throughout the measurement. As can be seen in Fig. 1B, this is not the case, as Co is more volatile than Mo and Ti. Thus, the use of Co as internal standard was in fact a bit detrimental for precision, as RSD values between 7 and 8% were obtained for Mo and Ti signals in urine, while these values deteriorated to 10–12% when the Ti/Co and Mo/Co signals were considered. This fact proves that, when there is no good correlation between the sources of noise of the analyte(s) and of the element selected as IS, the use of this IS only increases the overall uncertainty of the measurement [29].

Despite this issue, which prevents Co from being used as IS efficiently, Co was still added in some experiments to evaluate its distribution in the filter paper in comparison with those of Mo and Ti and, perhaps most important, because its use gave rise to a purplish tonality in the spiked urine samples, which was very useful in the experiments with DUS samples, in order to clearly establish their area.

3.2. Initial experiments with DUS: distribution of the analytes on the spot

After optimization of the conditions for Mo and Ti monitoring, analysis of DUS samples was investigated. For this purpose, urine was deposited on Whatman no. 903 FPs with a micropipette, dried, and then 3.2 mm disks were punched out of the DUS samples and directly analyzed by means of HR CS GFAAS. The signals obtained were similar in shape to those shown before for liquid urine samples, although they appeared to be a bit delayed (1.0–1.5 s) and showed

more tailing. Thus, the atomization time was increased to 15 s. However, the sensitivity was not satisfactory, because AAS signals were observed only when analyte concentrations reached hundreds of μg L^{-1}. This problem can be attributed to the procedure of sample deposition and the physical characteristics of urine.

Unlike the situation for dried blood spots, for which there seems to be a good degree of agreement among bioanalytical agencies/forums of different countries on the best collection methodology (National Committee for Clinical Laboratory Standards, USA [33], European Bioanalysis Forum [44]), there is no such consensus with respect to DUS collection. When depositing a small volume of urine on big sized paper cards, in the same way as it is typically done for blood, a liquid with low viscosity such as urine will spread more freely and, therefore, over a considerably larger area than blood, which will reduce the amount of sample per area unit. Therefore, the amount introduced in the graphite furnace in every individual disk of 3.2 mm (see Section 2.2.2.) will be too low. Fig. 2A illustrates how depositing a higher amount of sample does not serve to alleviate this problem, since the sample simply occupies a proportionally higher area (the area occupied per μL deposited was found to be very constant with a value of approx. 0.08 cm^2).

In order to increase the amount of analyte introduced into the graphite furnace, several approaches could be intended: i) to introduce several disks in each analytical run. It is in principle possible to stack up to three disks in the platform, however, this solution is a bit cumbersome and will not provide a sufficiently high improvement of sensitivity; ii) the use of another kind of paper with greater absorption capabilities, as proposed in the literature for DMS analysis in some occasions [13,45]. Obviously, there are many brands and kinds of filter paper with variable thickness and wet strength (absorbency) available in the market, and they may represent analytical alternatives to Whatman 903 or Perkin 226 (the only two FP approved by the FDA as medical class II devices). However, we do not consider this solution as satisfactory, because it would represent a difficulty for the method to be used in the clinical field, where only materials with highly regulated characteristics can be deployed. iii) to multi-spot the same paper, requiring drying (typically 4 h) after every deposition. Obviously, this solution requires more effort, and it is not very attractive, in particular to develop a method that permits unsupervised home-based collection of the sample. Therefore, a different approach is needed.

Moreover, in addition to the low sensitivity, the deposition of urine on the filter paper in free-diffused mode poses an additional problem concerning the analyte distribution across the filter. To investigate this issue, DUS samples were prepared with urines spiked up to a concentration high enough for the analytes to be measured in free-diffused DUS and analyzed at different areas, as shown in Fig. 2B. The results are presented in Fig. 3, demonstrating that there are chromatographic effects and the three elements monitored appear to have different migration properties. Ti tends to accumulate in the center of the spot, while Mo tends to migrate more to the rim. Co shows a more uniform distribution, although its accumulation in the very edge can be observed by naked eye, and it actually helps it in defining the border of the spot, as discussed in the previous section.

The latter fact is fairly relevant. As the technology of DMS extends to biological samples of nature different from blood, it is more important to see the dried spot in the FP, inasmuch as, when working with DMS, it is recommended to punch out of the same position of the spot [44], and samples as serum, urine or even cerebrospinal fluid are very difficult, or impossible, to visualize when spotted and dried in a FP. In fact, Whatman has recently marketed a blue FP card to overcome such problem when working with this kind of samples. The use of Co was an advantage in this situation because when organic colorants (methyl orange and eriochrome black T) were used to visualize the spots, they all remained in the center, therefore not being useful for this purpose.

The use of multi-spotting (3, 5 and even 10 times) was evaluated to see if a more homogeneous distribution could be attained, but it did not solve the problem, as the same trends discussed above persisted.

Finally, it can be mentioned that the migration behavior also depended on the amount of liquid deposited. The higher the volume that was deposited, the more proportion of every element that was staying in the center of the spot. It seems logical that the elements are somewhat retained by interaction with cellulose, making it more difficult for them to migrate over the longer distances obtained when the volume increased (see Fig. 2A).

This situation makes it very complicated to develop a suitable quantification approach, as the exact position from which the disk is punched out will strongly affect the results obtained. Since different elements behave in a different way, it is not feasible to use an internal standard to correct for this effect, which was the initial idea behind the addition of Co. Moreover, the matrix may play a role in the results obtained, because, while the trends discussed before hold true for all the urine samples investigated, the extent to which the elements concentrated in the center or over the edge varied to some degree (up to 20–30% differences were observed among different samples), clearly indicating a matrix influence in the process.

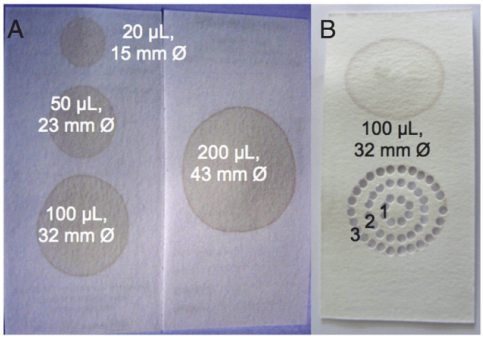


Fig. 2. A) Size of the free-diffused DUS created after depositing different volumes of urine onto a Whatman no. 903 FP card. The non-printed side was chosen for deposition for the sake of clarity. B) DUS resulting after deposition of 100 μL of urine. The dark rim is a consequence of the addition of Co (500 mg L^{-1}) and the preferential migration of Co to the periphery. The spot was sampled from three different zones to study the spatial distribution of the target elements: 1 (3 mm from the center), 2 (9 mm from the center) and 3 (15 mm from the center).

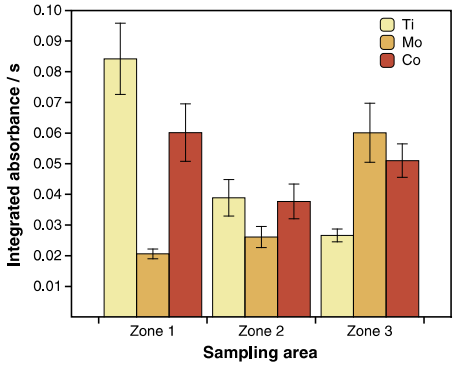


Fig. 3. Integrated absorbance for a free-diffused DUS sample, prepared after deposition of 100 μL of urine spiked with 500 μg Mo L^{-1}, 2000 μg Ti L^{-1} and 1000 mg Co L^{-1}, as a function of the zone (see Fig. 2B) from where the 3.2 mm disks were punched out.

In conclusion, a different procedure for sample deposition is needed in order to develop a method that could be sufficiently sensitive, but also reliable enough to permit quantification.

3.3. Precut-saturated DUS (PS-DUS)

In order to solve the problem of excessive sample diffusion on the filter paper, which leads to poor sensitivity and chromatographic effects, some authors have proposed the use of Teflon sheets or membranes instead of clinical filter papers. Self-evidently, owing to its hydrophobic properties, the urine deposited on top of a Teflon filter membrane will occupy a much smaller space [16]. While this solution may improve the situation from an analytical point of view, it is, however, not very practical for clinical purposes, as the sample only sticks to its surface of the membrane resulting in a much less stable specimen, unsuitable for being dried and mailed.

Alternatively, a more appealing alternative still based on the use of filter paper types registered by the US Food and Drug Administration (FDA) as Class II Medical Devices was demonstrated in a work aiming at LA–ICP–MS analysis, which was very recently carried out by our research group [17]. This collection methodology, that we called "precut saturated (PS)-DUS", consists in cutting a portion of the filter paper, depositing this portion on top of a hydrophobic surface, such as polycarbonate, and dispensing an adequate volume of urine onto this precut filter paper (see Fig. 4A and B). In this way, the area where the urine is allowed to expand is limited.

Although this method requires dispensing an adequate volume of urine on the filter paper, that does not pose excessive problems for operation in unsupervised contexts, considering that disposable Pasteur pipettes that could dispense such volumes with enough accuracy are easily available.

However, despite the successful results reported in [17], there are fundamental differences in the way that the DUS is sampled and analyzed by means of LA–ICP–MS (where ablation of lines 400 μm wide that did not penetrate deeper than 20 μm in the filter were used), when compared with the approach studied in the current work (where larger portions — 3.2 mm diameter – of the complete filter, which is approx. 500 μm deep, are punched out). Moreover, Mo and Ti were not studied in [17], and, as discussed before, spatial distribution may be element dependent. Therefore, the PS-DUS approach needs to be properly evaluated in the present context.

In the current experiment, we used FP cards printed to be used in our local newborn screening program, and cut rectangular pieces of 17×19 mm from them (instead of smaller circles, as carried out in reference 17), to attain a surface large enough that permits to easily divide the PS-DUS in different zones from which several disks of 3.2 mm diameter can be punched out (see Fig. 4C).

For FP pieces of this size, the maximum urine volume retained by the surface tension is 500 μL, which represents that the sample retained per surface unit is theoretically (calculated comparing the total areas occupied by the spots) 12.5 times higher than that retained in the case of free-diffused DUS. This enrichment factor was confirmed experimentally by ratioing the signal intensities obtained upon direct analysis of both types of samples (pre-cut and free-diffused DUS) using HR CS GFAAS (in the case of free-diffused samples, disks were taken from what is defined as zone 2 in Fig. 2B, which should provide an average value). In this way, enrichment values of 12.1 ± 1.5 for Ti and 10.5 ± 1.0 for Mo were calculated. Moreover, using the PS-DUS approach urine cannot spread and is allowed to dry only, which should greatly minimize chromatographic effects. In order to confirm this fact, ten urine samples were analyzed by means of this approach, and the results are shown in Fig. 5. As

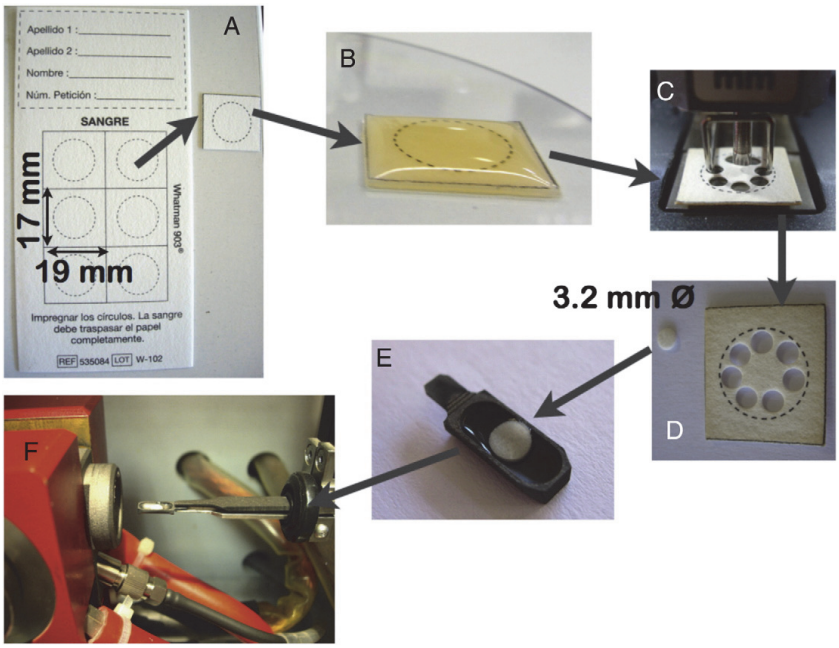


Fig. 4. Different steps for Mo and Ti determination in urine using the method proposed in this work. A) Whatman no. 903 FP card, showing a rectangular piece (17×19 mm) cut from it; B) the FP piece is placed on top of a hydrophobic surface (PC) and 500 μL of urine are deposited onto it; C and D) after drying (4 h), 3.2 mm disks are punched out the FP piece from selected positions; E) deposition of a urine-embedded 3.2 mm Ø disk into a graphite platform containing the chemical modifier solution (Pt); F) the platform is automatically introduced into the graphite furnace and subjected to the temperature program (see Table 1).

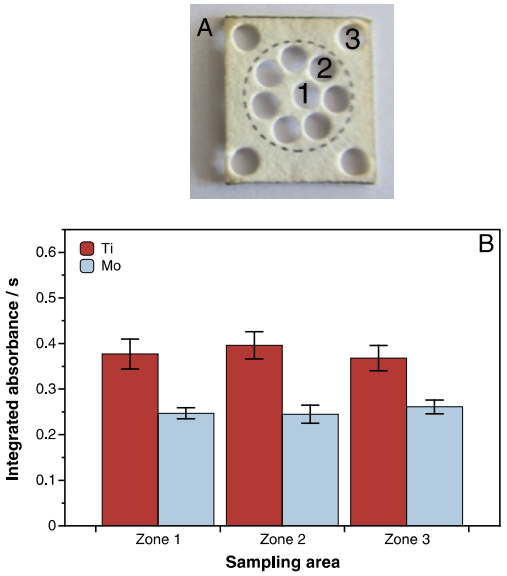


Fig. 5. A) Sampling of a PS-DUS from different zones (1, 2 and 3) to investigate analyte distribution. The size of the FP piece is 17 × 19 mm; B) Mo and Ti integrated absorbance for PS-DUS prepared as described in Fig. 4, as a function of the zone (see panel A) from where the 3.2 mm disks were punched out. For the preparation of these PS-DUS, ten different urine samples spiked with 100 μg Mo L^{-1} and 500 μg Ti L^{-1} were used, as described in Section 2.2.3. Error bars represent the standard deviation of the measurements.

shown for the different urines, a satisfactory degree of homogeneity in the distribution of the target elements (Mo and Ti, addition of Co is no longer necessary since the edge of the spot does not need to be identified with this approach and its use as IS was disregarded) was achieved.

It can be stated that the very rim of the PS-DUS may still show a higher concentration than the rest of the PS-DUS, as observed for other analytes when doing imaging by means of LA–ICP–MS [17]. With the current methodology, since it is necessary to punch out disks of 3.2 mm, the spatial resolution achieved is too low to detect this aspect. The practical conclusion is that this edge should be avoided when punching, which does not pose any practical limitation, since the rest of the PS-DUS shows a homogeneous distribution and promising sensitivity for analysis, and the area of the PS-DUS is of sufficient size to extract up to 11 disks, which is more than needed for analysis (3 replicates should be enough). In practice, the inner circle inked in every piece is a good reference for punching disks (see Fig. 4D).

3.4. PS-DUS solid sampling HR CS GFAAS procedure for Mo and Ti monitoring in urine: calibration approach and analytical performance

This procedure for sample deposition was validated by analysis of two reference materials commonly employed in clinical labs: Clincheck® Urine Control Level II and Seronorm® Trace Element Urine Control. As discussed in Section 2.2.2., Ti is absent in the Clincheck control and is near the quantification limit in the Seronorm control, so both materials were spiked with a Ti solution until a final concentration of 100 and 121 μg Ti L^{-1}, respectively, was reached.

As has been extensively discussed in the literature, the more reliable method of calibration when analyzing DMS is the use of matrix-matched standards [11,44]. Thus, a set of aliquots from the same analyte-free urine was spiked with variable amounts of Mo and Ti, from 20 μg L^{-1} to 500 μg L^{-1}, and the corresponding PS-DUS standards were prepared, as described in Sections 2.2.3. The figures of merit calculated are displayed in Table 2. Analysis of the reference materials using this calibration approach yielded satisfactory results, as demonstrated by the results presented in Table 3.

It can be stated that, particularly for Ti, the relatively high LODs obtained are still not suitable for analysis of healthy patients for which actually the use of sector field-ICP-MS should be recommended, as values of a few μg L^{-1} or below are expected [1,2]. However, still the procedure proposed in the current paper seems appropriate for implementation of simple home-based protocols, as it certainly may determine the high concentrations expected in case of malfunctioning implants.

On the other hand, only for very high amounts of Mo or Ti (from 1000 μg L^{-1}) significant memory effects were observed. Certainly these concentrations are not expected in human urines. Concerning the tube lifetime, typically 200–250 heating cycles could be carried out before serious tube aging occurred.

3.5. Behavior of dried aqueous solution spots

Finally it could be worth mentioning that, since the volume of urine retained in the PS-DUS is known, in principle, aqueous standards could be used for calibration, depositing them on the same kind of precut FP discussed before. These specimens are named DSS (dried solution spots).

Certainly, the use of precut FP may help in developing an approach based on the use of aqueous standards, since the liquid sample has no freedom to migrate. In the case of free-diffused spots, it was noticed that the spots originating from urine were approximately 5–10% smaller in size than those prepared using an equal volume of an aqueous standard, which would induce a difference in the signals obtained if direct deposition on large FPs would be attempted. Moreover, the different elements studied did not show exactly the same migration behavior in DSS and in DUS, therefore making the use of aqueous standards for calibration hardly possible, unless precut FPs are used.

Thus, precut-saturated dried aqueous solution spots (PS-DSS) were prepared in the same way that urine spots, by pipetting 500 μL of the corresponding standard solutions onto the filter paper pieces and drying. PS-DSS showed good homogeneity in all the area for both Mo and Ti, as already seen for PS-DUS. However, it become obvious that matrix effects occurred during the measurements, since the slopes of the calibration curves obtained were 20–30% different from those achieved with urine matrix-matched standards. That kind of bias might be acceptable for some applications with solid samples where it is difficult to find adequate standards of similar composition to the samples of interest. However, this is not really the case, as it is relatively straightforward for a clinical lab to spike urines of known Mo and Ti content or, alternatively, to use commercially available urine reference materials for calibration.

Table 2
Analytical performance of HR CS GFAAS for the direct determination of Mo and Ti in PS-DUS.

Element	Wavelength/nm	Characteristic mass/μg L^{-1}	LOD/μg L^{-1}	Slope of calibration curve/s/μg L^{-1}	Working range/μg L^{-1}	R^2
Mo	319.397	1.6	1.5	0.00255	Up to 500	0.999
Ti	319.200	6.6	6.5	0.00063	Up to 500	0.994

Table 3
Results obtained for the simultaneous determination (n = 5) of Mo and Ti in two commercial reference controls by means of solid sampling HR CS GFAAS in PS-DUS. Uncertainties are expressed as standard deviations, except for Mo in Clincheck II (95% confidence interval).

Element	Wavelength/nm	Clincheck II		Seronorm	
		Result/μg L^{-1}	Reference value/μg L^{-1}	Result/μg L^{-1}	Reference value/μg L^{-1}
Mo	319.397	103.5 ± 8.1	109 ± 22	50.4 ± 2.5	49.3 ± 1.3
Ti	319.200	98.9 ± 9.8	100[a]	123 ± 12	121[b]

[a] The sample does not contain Ti and was spiked with 100 μg L^{-1} Ti.
[b] The sample contained 21.0 ± 3.1 μg L^{-1} Ti, and was spiked with 100 μg L^{-1} Ti.

4. Conclusions

This work reports a general methodology for the direct determination of trace elements at the μg L^{-1} level in urine samples deposited on clinical filter papers by means of solid-sampling HR CS GFAAS. The method proposed permits the simultaneous determination of Mo and Ti, which could be relevant in the context of monitoring the functioning of metallic implants in humans.

The method obviously benefits from the performance of HR CS GFAAS instrumentation, which permits the simultaneous measurement of the target analytes in contrast with classic line source AAS. Another key aspect is the novel sampling approach investigated, based on the use of precut FPs capable of retaining large amounts of urine, which is crucial for achieving sufficient sensitivity for the analysis and to correct for the inhomogeneous distribution of the analytes observed when the urine is permitted to diffuse freely on filter papers of greater size. Moreover, this sampling methodology is compatible with home-based sample collection protocols, for which the use of DUS will indubitably make an impact in the near future.

The method developed for Mo and Ti in DUS, in spite of having a sensitivity not suitable to quantify Ti in well-functioning implanted patients, would be fit-for-purpose as a screening method for repeated analysis of patients experiencing problems with their prostheses, since it could detect the levels expected in patients with failed implants.

Acknowledgments

This work has been funded by the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (project CTQ2012-33494) and the Aragón Government (Fondo Social Europeo).

References

[1] A. Sarmiento-González, J. Ruiz Encinar, J.M. Marchante-Gayón, A. Sanz-Medel, Titanium levels in the organs and blood of rats with a titanium implant, in the absence of wear, as determined by double-focusing ICP-MS, Anal. Bioanal. Chem. 393 (2009) 335–343.
[2] Y. Nuevo Ordóñez, M. Montes-Bayón, E. Blanco-González, J. Paz-Jiménez, J.M. Tejerina-Lobo, J.M. Peña-López, A. Sanz-Medel, Metal release in patients with total hip arthroplasty by DF-ICP-MS and their association to serum proteins, J. Anal. At. Spectrom. 24 (2009) 1037–1043.
[3] P.A. Vendittoli, A. Roy, S. Mottard, J. Girard, D. Lusignan, M. Lavigne, Metal ion release from bearing wear and corrosion with 28 mm and large-diameter metal-on-metal bearing articulations, J. Bone Joint Surg. Br. 92 (2010) 12–19.
[4] Y. Nuevo-Ordóñez, M. Montes-Bayón, E. Blanco-González, J. Paz-Aparicio, J. Diánez Raimundez, J.M. Tejerina, M.A. Peña, A. Sanz-Medel, Titanium release in serum of patients with different bone fixation implants and its interaction with serum biomolecules at physiological levels, Anal. Bioanal. Chem. 401 (2011) 2747–2754.
[5] M.S. Patton, T.D.B. Lyon, G.P. Ashcroft, Levels of systemic metal ions in patients with intra-medullary nails, Acta Orthop. 79 (2008) 820–825.
[6] J.J. Jacobs, A.K. Skipor, P.A. Campbell, N.J. Hallab, R.M. Urban, H.C. Amstutz, Can metal levels be used to monitor metal-on-metal hip arthroplasties? J. Arthroplasty 19 (2004) 59–65.
[7] S.S. Leopold, R.A. Berger, L. Patterson, A.K. Skipor, R.M. Urban, J.J. Jacobs, Serum titanium level for diagnosis of a failed, metal-backed patellar component, J. Arthroplasty 15 (2000) 938–943.
[8] D. Schiopu, J. Girard, M. Soenen, N. Krantz, H. Migaud, Metal ions levels measurements for early total hip replacement malfunction diagnosis with "plasma-sprayed ceramic" bearings couple, Orthop. Traumatol. Surg. Res. 96 (2010) 75–79.
[9] J. del Rio, J. Beguiristain, J. Duart, Metal levels in corrosion of spinal implants, Eur. Spine J. 16 (2007) 1055–1061.
[10] Medicines, Health products Regulatory Agency, Medical Device Alert Ref: MDA/2012/008, http://www.mhra.gov.uk, (last accessed 04/12/2012).
[11] S. Tanna, G. Lawson, Analytical methods used in conjunction with dried blood spots, Anal. Methods 3 (2011) 1709–1718.
[12] C. Auray-Blais, P. Lavoie, H. Zhang, R. Gagnon, J.T.R. Clarke, B. Maranda, S.P. Young, Y. An, D.S. Millington, An improved method for glycosaminoglycan analysis by LC–MS/MS of urine samples collected on filter paper, Clin. Chim. Acta 413 (2012) 771–778.
[13] H. Blasco, M.-A. Garrigue, A. De Vos, C. Antar, F. Labarthe, F. Maillot, C.R. Andres, L. Nadal-Desbarats, Filter paper saturated by urine sample in metabolic disorders detection by proton magnetic resonance spectroscopy, Anal. Bioanal. Chem. 396 (2010) 1205–1211.
[14] T.W. McDade, S. Williams, J.J. Snodgrass, What a drop can do: dried blood spots as a minimally invasive method for integrating biomarkers into population-based research, Demography 44 (2007) 899–925.
[15] C. Auray-Blais, D. Cyr, R. Drouin, Quebec neonatal mass urinary screening programme: from micromolecules to macromolecules, J. Inherit. Metab. Dis. 30 (2007) 515–521.
[16] U. Kumtabtim, A. Siripinyanond, C. Auray-Blais, A. Ntwari, J.S. Becker, Analysis of trace metals in single droplet of urine by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, Int. J. Mass Spectrom. 307 (2011) 174–181.
[17] M. Aramendía, L. Rello, F. Vanhaecke, M. Resano, Direct trace-elemental analysis of urine samples by laser ablation–inductively coupled plasma–mass spectrometry after sample deposition on clinical filter papers, Anal. Chem. 84 (2012) 8682–8690.
[18] M. Resano, L. Rello, E. Garcia-Ruiz, M.A. Belarra, Minimally-invasive filter paper test in combination with solid sampling-graphite furnace atomic absorption spectrometry for Pb determination in whole blood, J. Anal. At. Spectrom. 22 (2007) 1250–1259.
[19] J.V. Cizdziel, Determination of lead in blood by laser ablation ICP-TOF-MS analysis of blood spotted and dried on filter paper: a feasibility study, Anal. Bioanal. Chem. 388 (2007) 603–611.
[20] J.C. Rockett, G.M. Buck, C.D. Lynch, S.D. Perreault, The value of home-based collection of biospecimens in reproductive epidemiology, Environ. Health Perspect. 112 (2004) 94–104.
[21] E.K. Langer, K.J. Johnson, M.M. Shafer, P. Gorski, J. Overdier, J. Musselman, J.A. Ross, Characterization of the elemental composition of newborn blood spots using sector-field inductively coupled plasma-mass spectrometry, J. Expo. Sci. Environ. Epidemiol. 21 (2011) 355–364.
[22] T.-M. Do, H.-F. Hsieh, W.-C. Chang, E.E. Chang, C.-F. Wang, Analysis of liquid samples using dried-droplet laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, Spectrochim. Acta Part B 66 (2011) 610–618.
[23] H.-F. Hsieh, W.-S. Chang, Y.-K. Hsieh, C.-F. Wang, Lead determination in whole blood by laser ablation coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry, Talanta 79 (2009) 183–188.
[24] M. Resano, F. Vanhaecke, M.T.C. de Loos-Vollebregt, Electrothermal vaporization for sample introduction in atomic absorption, atomic emission and plasma mass spectrometry—a critical review with focus on solid sampling and slurry analysis, J. Anal. At. Spectrom. 23 (2008) 1450–1475.
[25] M.G.R. Vale, N. Oleszczuk, W.N.L. dos Santos, Current status of direct solid sampling for electrothermal atomic absorption spectrometry—a critical review of the development between 1995 and 2005, Appl. Spectrosc. Rev. 41 (2006) 377–400.
[26] B. Welz, D.L.G. Borges, F.G. Lepri, M.G.R. Vale, U. Heitmann, High-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry — an analytical and diagnostic tool for trace analysis, Spectrochim. Acta Part B 62 (2007) 873–883.
[27] B. Welz, S. Morés, E. Carasek, M.G.R. Vale, M. Okruss, H. Becker-Ross, High-resolution continuum source atomic and molecular absorption spectrometry—a review, Appl. Spectrosc. Rev. 45 (2010) 327–354.
[28] M. Resano, E. García-Ruiz, High-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry: is it as good as it sounds? A critical review, Anal. Bioanal. Chem. 399 (2011) 323–330.
[29] M. Resano, L. Rello, M. Flórez, M.A. Belarra, On the possibilities of high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry for the simultaneous or sequential monitoring of multiple atomic lines, Spectrochim. Acta Part B 66 (2011) 321–328.
[30] I.M. Dittert, J.S.A. Silva, R.G.O. Araujo, A.J. Curtius, B. Welz, H. Becker-Ross, Direct and simultaneous determination of Cr and Fe in crude oil using high-resolution continuum source graphite furnace atomic absorption spectrometry, Spectrochim. Acta Part B 64 (2009) 537–543.
[31] L.M.G. dos Santos, R.G.O. Araujo, B. Welz, S. do C. Jacob, M.G.R. Vale, H. Becker-Ross, Simultaneous determination of Cd and Fe in grain products using direct solid sampling and high-resolution continuum source electrothermal atomic absorption spectrometry, Talanta 78 (2009) 577–583.

[32] B. Welz, H. Becker-Ross, S. Florek, U. Heitmann, High-Resolution Continuum Source AAS: The Better Way to Do Atomic Absorption Spectrometry, Wiley-VCH, Weinheim, Germany, 2005.
[33] W.H. Hannon, R.J. Whitley, B. Davin, P. Fernhoff, T. Halonen, M. Lavochkin, J. Miller, J. Ojodu, B.L. Therrell, Blood Collection on Filter Paper for Newborn Screening Programs; Approved Standard—Fifth Edition. NCCLS document LA4-A5 (ISBN 1-56238-644-1) NCCLS, Wayne, Pennsylvania, USA, 2007.
[34] N.M. Desy, S.G. Bergeron, A. Petit, O.L. Huk, J. Antoniou, Surgical variables influence metal ion levels after hip resurfacing, Clin. Orthop. Relat. Res. 469 (2011) 1635–1641.
[35] I.N.B. Castilho, B. Welz, M.G.R. Vale, J.B. de Andrade, P. Smichowski, A.A. Shaltout, L. Colares, E. Carasek, Comparison of three different sample preparation procedures for the determination of traffic-related elements in airborne particulate matter collected on glass fiber filters, Talanta 88 (2012) 689–695.
[36] T.M. Sørlie, G. Wibetoe, Determination of titanium by slurry sampling graphite furnace atomic absorption spectrometry with the use of fluoride modifiers, Anal. Bioanal. Chem. 376 (2003) 721–727.
[37] A. Asfaw, G. Wibetoe, Freon (CHF3)-assisted atomization for the determination of titanium using ultrasonic slurry sampling—graphite furnace atomic absorption spectrometry (USS–GFAAS): a simple and advantageous method for solid samples, Anal. Bioanal. Chem. 379 (2004) 526–531.
[38] H.-J. Heinrich, R. Matschat, Investigations on Freon-assisted atomization of refractory analytes (Cr, Mo, Ti, V) in multielement electrothermal atomic absorption spectrometry, Spectrochim. Acta Part B 62 (2007) 807–816.
[39] I. López-García, P. Viñas, R. Romero-Romero, M. Hernández-Córdoba, Liquid chromatography–electrothermal atomic absorption spectrometry for the separation and preconcentration of molybdenum in milk and infant formulas, Anal. Chim. Acta 597 (2007) 187–194.
[40] E.A. Piperaki, N.S. Thomaidis, I. Demis, Platinum group metals as chemical modifiers for the determination of molybdenum by electrothermal atomic absorption spectrometry, J. Anal. At. Spectrom. 14 (1999) 1901–1906.
[41] D. Barałkiewicz, J. Siepak, Determination of trace amounts of molybdenum in water samples by graphite furnace atomic absorption spectrometry with multiple injections and cool down step, Anal. Chim. Acta 353 (1997) 85–89.
[42] B. Welz, M. Sperling, Atomic Absorption Spectrometry, 3rd ed. Wiley-VCH, Weinheim, 1999.
[43] S.R. de Oliveira, J.A.G. Neto, Evaluation of Bi as internal standard to minimize matrix effects on the direct determination of Pb in vinegar by graphite furnace atomic absorption spectrometry using Ru permanent modifier with co-injection of Pd/Mg(NO_3)$_2$, Spectrochim. Acta Part B 62 (2007) 1046–1050.
[44] P. Timmerman, S. White, S. Globig, S. Lüdtke, L. Brunet, J. Smeraglia, EBF recommendation on the validation of bioanalytical methods for dried blood spots, Bioanalysis 3 (2011) 1567–1575.
[45] F. Li, J. Zulkoski, D. Fast, S. Michael, Perforated dried blood spots: a novel format for accurate microsampling, Bioanalysis 3 (2011) 2321–2333.

JAAS

RSC Publishing

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

Direct determination of Cu isotope ratios in dried urine spots by means of fs-LA-MC-ICPMS. Potential to diagnose Wilson's disease

Cite this: *J. Anal. At. Spectrom.*, 2013, **28**, 98

Martín Resano,*[a] Maite Aramendía,[b] Luis Rello,[c] M[a] Luisa Calvo,[c] Sylvain Bérail[d] and Christophe Pécheyran[d]

This work investigates the potential of a 257 nm femtosecond (fs) laser ablation (LA) device operating at a high repetition rate (10 000 Hz) coupled to a multicollector (MC)-ICPMS to develop a method for the direct determination of Cu ratios in dried urine spots, prepared by deposition of urine (300 μL) onto precut clinical filter paper discs (16 mm diameter). The sampling capabilities offered by the fs LA system, permitting ablation of 150 μm thick coronas in the rim area of the filter, together with the use of admixed Ni as an internal standard, the proper optimization of the MC-ICPMS conditions (*e.g.*, use of pseudo high-resolution mode to avoid interferences) and the use of a data processing approach particularly suitable for short transient signals (linear regression fit) enabled analysis of real urine samples with precision values around 500 ppm (RSD) for urinary Cu contents of a few hundred μg L^{-1}. The methodology developed could prove to be useful for implementing screening protocols to detect Wilson's disease (WD), a well-known disorder related to Cu metabolism. In fact, the use of this analytical methodology permitted us to observe significant differences between (i) untreated WD patients and (ii) WD patients that are under treatment and control samples. This work represents the first time that determination of $^{65}Cu/^{63}Cu$ ratios has been used in the context of WD research, and serves as a proof of principle, suggesting that Cu isotope analysis could help in developing earlier and more reliable means to diagnose WD.

Received 19th September 2012
Accepted 24th October 2012

DOI: 10.1039/c2ja30262d

www.rsc.org/jaas

1 Introduction

Cu is an essential element for the proper functioning of several metaloenzymes with oxidase activity. In this way, Cu takes part in energy production (cytochrome C oxidase), iron metabolism (ceruloplasmin), antioxidant functions (superoxidase dismutase), connective tissue formation (lysyl oxidase), neurotransmitter metabolism (dopamine β-hydroxylase and monoamine oxidase), spermine oxidase, melanin formation (tyrosinase) and intermediate metabolism (uricase, benzylamine oxidase and diamine oxidase). Approximately 50% of dietary Cu is absorbed in the duodenum and proximal small intestine, and the process is facilitated by the complexing of Cu with amino acids. In plasma, approximately 75–90% of Cu is bound to ceruloplasmin, a ferroxidase whose function is essential for iron metabolism. The non-bound-ceruloplasmin plasma Cu, loosely bound to α-2 macroglobulin, albumin and amino acids (mainly histidine), participates in the interchangeable fraction of Cu between tissues.[1]

The most prominent disorders related to Cu metabolism are the genetically determined Wilson's disease (WD), Menkes disease and occipital horn's syndrome (a mild form of Menkes disease).[1] Although Menkes disease is usually fatal in the early infancy, WD can be treated if diagnosed before the onset of symptoms, when irreversible damage has not occurred yet. Being the most prevalent of the three (its incidence is approximately 1 in 30 000), WD diagnosis is a field of extensive research.[2]

In short, WD is caused by mutations in the *ATP7B gene*, which encodes the ATP7B protein that is essential for Cu metabolism in hepatocytes. This protein facilitates the transfer of Cu ions to the main plasma Cu protein mentioned before, ceruloplasmin, and its release into the bloodstream, as well as the removal of excess Cu by secreting it into bile. Both functions of ATP7B are impaired in WD patients. As a consequence, Cu accumulates in the liver tissue, among other organs, while ceruloplasmin is still secreted but in a form that lacks Cu, named apoceruloplasmin, which is rapidly degraded in the bloodstream.[3]

[a]*University of Zaragoza, Faculty of Sciences, Department of Analytical Chemistry, Pedro Cerbuna 12, Zaragoza, E-50009, Spain*
[b]*Centro Universitario de la Defensa-Academia General Militar de Zaragoza, Carretera de Huesca s/n, 50090, Zaragoza, Spain*
[c]*Department of Clinical Biochemistry, "Miguel Servet" Universitary Hospital, Paseo Isabel La Católica 1-3, 50009, Zaragoza, Spain*
[d]*LCABIE, IPREM UMR 5254, CNRS – Université de Pau et des Pays de l'Adour, 64053, Pau cedex 9, France*

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

From an analytical point of view, this means that patients of WD show low levels of both Cu and ceruloplasmin in blood and serum. Conversely, they show relatively higher contents of Cu in urine. This could open possibilities for diagnosis, but superimposed intervals have been observed between controls and affected patients, especially in young infants, due to the immaturity of the liver.[3–5] There is still no totally reliable test to diagnose this disease and the golden standard is a liver biopsy.[6,7] The lack of a near 100% sensible marker has prevented the implementation of a well-established neonatal screening protocol, in contrast to other genetic diseases that are less prevalent and less tractable. Still, investigation of potential screening procedures for WD diagnostic is a topic of great interest in the field of paediatrics.[8,9]

Instead of relying on elemental concentration, another possibility worth exploring is isotopic analysis. Taking into account that isotope fractionation typically accompanies (bio) chemical reactions,[10] it could be expected that the protein ATP7B would interact with the two natural occurring isotopes of Cu (^{63}Cu and ^{65}Cu) with slightly different yields, which may be hard to measure in the case of well-functioning proteins operating with an efficiency close to 100%. However, the defective ATP7B protein found in WD patients shows a much lower efficiency for Cu incorporation into ceruloplasmin, as discussed before, and hence, the preferential presence of one of the two natural occurring Cu isotopes in biological fluids could become more apparent for WD patients with respect to people with low levels of Cu due to other reasons (for example, premature infants or adults following bariatric surgery procedures).[11] In this case, the development of a proper methodology for the determination of Cu isotope ratios may open new possibilities for early detection of WD.

In this context, the development of multicollector inductively coupled plasma mass spectrometry (MC-ICPMS) has brought a new dimension to the field of isotopic analysis. This technique is characterized by lower requisites in terms of sample preparation when compared with more traditional techniques (*e.g.*, thermal ionization mass spectrometry, TIMS), thus offering higher sample throughput, while its precision still rivals that of TIMS (down to 0.001% RSD in the best of cases), and it is significantly superior (a factor of 50–100) to that attainable by means of quadrupole-based ICPMS or sector field ICPMS.[10] Moreover, the higher efficiency of the ICP to produce positively charged ions from nearly all elements in the periodic table has triggered the exploration of new isotopic systems, opening research possibilities in many new fields apart from those in which the use of isotopic analysis was already well-established (*e.g.*, geochemistry and forensics). That includes the development of medical and biological applications,[11–14] although the presence of this type of instrument in clinical labs is still limited, probably owing to its cost and the need for expert technicians.

In any case, for neonatal screening purposes, the methodology to be developed should profit from the screening programs for metabolic diseases already implemented throughout the world. Thus, to gain broad diffusion, the analytes must be assayed in the biological samples typically used, that is, blood and/or urine collected on standardized filter paper.[8,9] The use of these clinical specimens offers many advantages, particularly in terms of logistics, such as the possibility to preserve samples at room temperature and to transport them over large distances by regular mail for analysis at referral centers, which makes them ideal for the application of screening schemes.[15]

It is the purpose of this work to investigate a method for direct isotopic analysis of Cu in urine samples adsorbed and dried on clinical filter papers (the so-called dried urine spots, DUS), in an attempt to establish potential differences for WD patients, which, to the best of our knowledge, have not been reported before. In order to achieve this goal, a MC-ICPMS coupled to a UV high-repetition-rate femtosecond laser ablation (fs-LA) system will be deployed. This coupling may combine the high precision typical of MC-ICPMS, clearly required to appreciate significant differences in this case, with the flexible sampling possibilities of this new UV fs-LA device, needed to obtain sufficient sensitivity. The selection of urine and not blood for this first study is based on the relatively less complex nature of the sample.

2 Experimental

2.1 Instrumentation

All measurements were carried out on a Nu Plasma HR-MC-ICPMS instrument (Nu instruments, Wrexham, UK) coupled to a Lambda 3 femtosecond laser ablation system (Nexeya SA, Canejan, France). This laser is fitted with a diode-pumped Yb:KGW crystal laser source (HP2, Amplitudes Systèmes, Pessac, France) delivering 360 fs pulses. Three wavelengths can be selected: 1030 nm (fundamental), 515 nm (2nd harmonic) and 257 nm (4th harmonic). The 257 nm wavelength was used in this study. Interestingly, the laser source operates within a wide range of repetition rate (1–100 kHz) and low energy (from 200 μJ per pulse below 1 kHz to 1.5 μJ per pulse at 100 kHz at this wavelength), which represents a new approach in analytical applications where high energy and low repetition rate are commonly used. The laser beam is focused with a 100 mm objective, and it can be rapidly moved (up to 2 m s^{-1}) with high repositioning precision owing to a 2D galvanometric scanning module fitted to the optical line. The optical field covered by the laser beam is 16 × 16 mm^2. Further details for a previous and similar model (operating in the IR region only) of this laser ablation system are described elsewhere.[16,17]

The LA-ICPMS coupling was carried out using a 10 m long antistatic tube (PTFE electroconductive, Fisher Bioblock, Illkirch Cedex, France) of 6 mm external diameter and 4 mm internal diameter (Legris SA) into the ICP torch, using He as the carrier gas. A two-inlet torch was used to mix the laser-generated aerosol together with a liquid aerosol (nebulized by means of a pneumatic 200 μL min^{-1} micro-concentric nebulizer combined with a mini-cyclonic Cinnabar spray chamber) before introduction into the plasma.[18,19] This dual-flow introduction system enables easy optimization of the MC-ICPMS by nebulizing a suitable solution for tuning. Furthermore, during laser ablation analyses, the plasma was kept under wet conditions by the

Table 1 Instrumental operating conditions used for isotopic analysis of the urine samples in the form of DUS

Laser ablation conditions															
Laser ablation system	Lambda 3														
Wavelength	257 nm														
Pulse duration	360 fs														
Repetition rate	10 000 Hz														
Spot diameter (airy $1/e^2$)	8 μm														
Energy/fluence	9.5 μJ/19 J cm^{-2}														
Scan speed (y axis)	10 mm s^{-1}														
Ablation strategy	Corona (150 μm thick), made with 20 concentric circles														
Transport gas	He, 500 mL min^{-1}														
Nu MC-ICPMS															
RF power	1300 W														
Instrument resolution	Pseudo-high resolution ~5700 (edge resolved power)														
Source slit width	0.05 mm														
Alpha 1 slit	80 mA														
Alpha 2 slit	90 mA														
Integration time	5 s														
Plasma gas flow rate	13.0 L min^{-1}														
Auxiliary gas flow rate	0.80 L min^{-1}														
Nebulizer pressure	28.8 psi														
Faraday cup configuration															
Collector	H7	H6	H5	H4	H3	H2	H1	Ax	L1	L2	IC0	L3	IC1	IC2	L4
m/*z*	65					63			62			61			

continuous nebulization of a Ni standard solution (1 mg L^{-1} in 0.14 M HNO_3), which is used to correct for mass bias.

Measuring conditions on both instruments were adjusted for maximum sensitivity and stability, plasma robustness and minimum influence of interferences on the analyte signals and are summarized in Table 1.

A graphite furnace atomic absorption spectrometer (GFAAS) Analytik Jena (Jena, Germany) ZEEnit 700 with Zeeman correction was used for determining the Cu levels in the urine samples.

A Sartorius (Goettingen, Germany) model BP211D analytical balance with a precision of 10^{-5} g was used for all weighing.

2.2 Samples and standards

2.2.1 Reagents and standards. Cu and Ni single-element solutions were prepared by diluting appropriate quantities of 1 g L^{-1} mono elemental standards (SCP sciences, Canada) with diluted nitric acid until a final concentration of 0.14 M HNO_3. NaCl solutions were prepared by dissolving a suitable amount of the solid reagent (Merck, Darmstadt, Germany) in 0.14 M HNO_3 to give a final Na concentration of 2500 mg L^{-1}. Pro-analysis nitric acid was purchased from Merck and further purified in a PTFE sub-boiling system. Ultrapure water with a resistivity of ≥18.2 mΩ cm was obtained from a Direct-Q3 system (Millipore, Mollsheim, France).

Clincheck® Urine Control Level II, a reference material used to check the performance of the analytical method developed, was obtained from Recipe chemicals + Instruments GmbH (Munich, Germany). This control is provided as a lyophilized material, which, once reconstituted with 10 mL of ultrapure water, contains certified quantities of several elements, including Cu.

Whatman no. 903 paper cards (formerly Schleicher & Schuell) (Lot W-092) were obtained from Whatman International Ltd. (Maidstone, Kent, UK). This is one of the two commercial paper sources registered by the FDA as Class II medical devices.[20] 16 mm diameter discs were punched out of these totally empty cards (no inked) using a manual paper punch (Artemio, Wavre, Belgium).

2.2.2 Samples and sample preparation. Urine samples from six volunteers affected by WD were obtained from the Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza, Spain). Three of these patients were following a treatment with a chelating agent (penicillamine) at the moment of sampling. On the other hand, the three remaining samples were from people who were just diagnosed and were not yet following any treatment. A sample from a volunteer not affected by any disease (control) was also measured.

For the preparation of the DUS samples, 300 μL aliquots of each of the urine samples were directly applied with a micropipette onto 16 mm diameter filter paper discs placed on disposable PS weighing boats. Samples were left to dry at room temperature for at least 4 h. Once dried, the paper discs containing the samples were kept in sealed plastic bags at room temperature until analysis.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

2.3 Procedure for LA-MC-ICPMS analysis of the samples

The parameters used for the analysis of the samples are summarized in Table 1. The samples were conveniently fixed in the ablation cell using a small amount of double-sided tape attached to their bottoms. 5 replicate measurements (five coronas, see Section 3.2.) were carried out per sample. For every replicate measurement, a signal of approximately 100 second duration was obtained. A Ni solution was always simultaneously nebulized, such that Ni could be used as an internal standard for correction of mass discrimination. Note that the isotopic composition of this Ni solution was not certified, which rules out the absolute determination of $^{65}Cu/^{63}Cu$ ratios. This was beyond the scope of this study. However this approach allowed the comparison of the Cu isotope ratios for the different samples.

In order to calculate Cu isotope ratios from these signals, a linear regression slope (LRS) method, where the signal intensities for ^{65}Cu were plotted against the signal intensities for ^{63}Cu, was used. The slope of the regression curve provides the raw $^{65}Cu/^{63}Cu$ ratio, which is later corrected for mass bias applying Russell's exponential law.[21] More details on this procedure are provided elsewhere.[22–24]

3 Results and discussion

3.1 Considerations on sensitivity and sample deposition

One of the main challenges of the topic evaluated in this work is the relatively low analyte content found in the urine of the patients subject to investigation. The actual Cu levels were determined prior to LA-MC-ICPMS analysis by means of the standard approach (using graphite furnace atomic absorption spectrometry[25]). The level of copper for WD patients that were following treatment with penicillamine (a chelating agent) was significantly higher, ranging from 128 to 699 μg L^{-1}, as could be expected because addition of this chelating agent helps in freeing Cu ions from the organs in which they are retained when suffering from WD (*e.g.*, liver).[6,7,26] However, the values for WD patients that were not yet following any treatment ranged between 34 and 73 μg L^{-1}, and for healthy persons similar or lower values are expected.

Although the MC-ICPMS deployed in this work is fitted with two ion counters, it is necessary to stress that its detector configuration does not permit to use them for the monitoring at m/z 63 and 65 simultaneously. Faraday cups have to be used instead, with the subsequent loss in sensitivity. Moreover, at these low levels, the contribution of interfering species may be significant, and, in particular, the contribution of $^{40}Ar^{23}Na^{+}$ to the Cu signal at a mass-to-charge (m/z) of 63 should be monitored, as NaCl is present in urine at the 1000 mg L^{-1} level.[12]

In order to minimize these problems, one of the key aspects may be the way in which urine is deposited onto the clinical filter paper, giving rise to the dried urine spot (DUS) sample. If urine is simply deposited on a relatively large filter paper card, as it is typically done for other biological samples such as blood, urine will spread over a significantly larger area than blood. As a result, the amount of immobilized sample per area unit will be lower, seriously degrading the sensitivity attainable by means of LA-ICPMS. In a recent paper aiming at multielemental analysis of DUS samples carried out in our lab, this issue was explored in detail and it was concluded that the best way to cope with it was to deposit the urine sample onto small precut paper pieces, thus limiting the area where the urine is allowed to expand.[27] Therefore, in this work, Whatman no. 903 paper cards were precut in paper discs of 16 mm and 300 μL of urine was deposited on each of them and left to dry. These amounts correspond to the maximum urine volume that the sample's surface tension retains on the paper discs, thus providing the highest possible sample concentration in the DUS specimens after a single drying cycle (≈150 μL urine per cm^2) which is about 10–12 times higher than the concentration obtained when urine is deposited on big-sized paper cards.

In addition to providing improved sensitivity, this solution is simple to follow even in an unsupervised context (*e.g.*, any patient could do it by him/herself using a disposable Pasteur pipette), it is straightforward in comparison with other approaches (*e.g.*, deposition and drying of urine multiple times) and prevents chromatographic effects from occurring, as the urine sample is not allowed to freely migrate on the cellulose support. It was demonstrated in the above-mentioned work[27] that the distribution of metals, including Cu, is more homogenous using the approach described before, even though there is still a significantly higher concentration (approx. a factor of 2) in the rim of the precut filter. In fact, this aspect could be used in our favor in the current work, as long as no spatial isotopic fractionation occurs on the paper surface.

Finally, it is important to mention that the Whatman no. 903 paper cards used in this work were blank cards containing no ink at all. It is often the case that the specimens used in the hospitals are inked to indicate the areas of preferred deposition. In our experience, this ink may contain some Cu impurities,[27] so it is preferable to use blank cards whenever possible.

3.2 Laser ablation-MC-ICPMS monitoring of the samples and potential interferences

Based on the Cu concentration previously detected in our samples, the absolute mass of copper deposited on filters was ranging within 38 ng to 210 ng (*i.e.* from 0.19 ng mm^{-2} to 1.05 ng mm^{-2}) for WD patients treated with penicillamine, and from 10 ng to 22 ng (*i.e.* from 0.05 ng mm^{-2} to 0.11 ng mm^{-2}) for untreated WD patients. Due to the low signal sensitivity of the MC-ICPMS fitted with Faraday cups, such low concentrations result in poor statistics, limiting precision and accuracy on the $^{65/63}Cu$ isotope ratio. Thus, an appropriate ablation strategy must be used to achieve sufficiently high signal intensities. Use of a femtosecond LA unit may be of great importance for this application. This type of laser provides well-known advantages for isotopic analysis, as its shorter pulse duration has been shown to drastically reduce thermal effects and minimize isotope fractionation and matrix dependencies in comparison to laser pulses in the nanosecond range.[28,29] Moreover, use of femtosecond laser ablation typically enhances signal intensity and stability, limiting the production of signal spikes due to

larger particles, eventually leading to improvements in precision and accuracy compared to nanosecond laser ablation.[30,31]

There are different types of fs-LA units in the market[32–34] but for this particular application perhaps the one that has been described by Pécheyran *et al.* in a number of works[16,17,19] is the best suited. Instead of using high energies (>1 mJ per pulse) and low repetition rates (1–20 Hz), as most common devices, this unit is based on the use of a relatively low-energy laser unit (up to 200 μJ per pulse at 257 nm). Thus, in order to keep a sufficiently high fluence, the laser spot used must be small (around 10 μm). However, this drawback can be compensated by combining a fast beam scanning system with the high repetition rate of the laser (up to 100 000 Hz). In other words, the small craters corresponding to the laser beam spot size (8 μm in our case) are repeated in such a way that they can be overlapped, while the beam and the sample are continuously displaced at constant rates. This strategy permits ablation of large areas in a reduced time, resulting in short transient signals, which dramatically enhance the signal-to-background ratios. This approach has proven to be satisfactory in increasing the sensitivity in relatively similar applications to the one studied in this work (*e.g.*, analysis of metals in gels[19]). Moreover, this unit permits high flexibility regarding the sampling of the urine filter because any desired geometrical form can be used in practice (lines, craters, coronas, *etc.*).

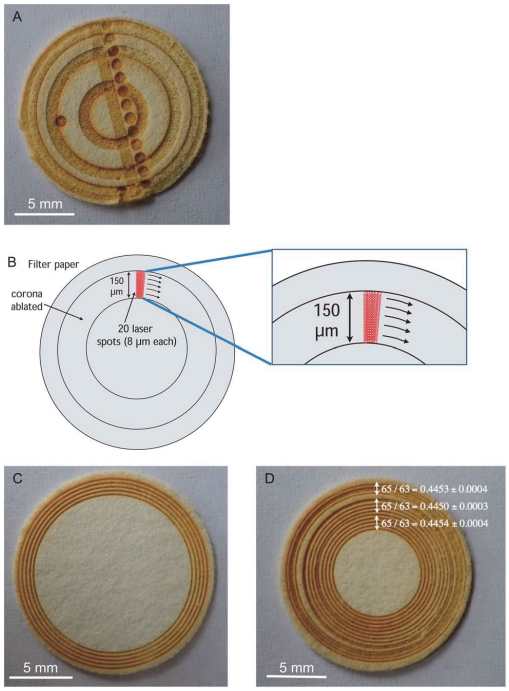


Fig. 1 (A) Example of DUS sample ablated using different sampling strategies (craters, coronas, rasters, *etc.*); (B) strategy for ablation of a 150 μm thick corona by means of the fast translation of a small laser spot (8 μm). For construction of the corona, 20 concentric circular lines were ablated; (C) example of DUS sample ablated at five different locations (5 replicates) using the corona sampling approach; (D) example of DUS sample ablated at 15 locations using the corona sampling approach, showing the spatially resolved $^{65}Cu/^{63}Cu$ ratios obtained. Uncertainties (error bars) are expressed as 2SD on the average value obtained for five different replicates.

The laser used in the current work represents an upgrade from the device described in those previous works,[16,17,19,35,36] as it operates in the UV region and not in the IR region. This, in principle, should be beneficial to further reduce fractionation[28] but its fundamental operating idea is the same. Thus, ablation of the DUS samples was evaluated using different geometries, as shown in Fig. 1A.

From these preliminary optimizations, different conclusions could be drawn: (a) ablation of the areas close to the rim offered the best sensitivity (a factor of two compared with the central area), as expected; (b) the ratios obtained deviated significantly from the expected ratios (natural ratio for Cu,[37] approx. 0.44613 for $^{65}Cu/^{63}Cu$), and they are consistently biased low, contrary to what can be expected if instrumental mass bias would be the dominant factor to explain these inaccuracies. There are indications of matrix-effects on the plasma (depletion of the Ni signal when the material ablated arrived to the plasma), which could contribute to some extent to the effect observed; however, the influence of $^{40}Ar^{23}Na^{+}$ on $^{63}Cu^{+}$ is probably very significant for this sample, which explains the results achieved; (c) carrying out very prolonged ablation was not recommended, as the signal drops if the ablation reaches the bottom of the filter paper.

Aspects (a) and (c) can be easily addressed owing to the potential of the LA unit for spatially resolved analysis. In the end, it was decided to ablate relatively small coronas 150 μm thick (difference between inner and outer radius), which are constructed by fast rotation of an 8 μm spot (using 20 concentric lines per corona, as illustrated in Fig. 1B), under the conditions shown in Table 1. This ablation strategy allowed ablation of approx. 7 mm^2 in about 100 s. The depth of the coronas varies with the radius (the shorter the radius the deeper the crater to ablate the same amount) but it is always in the range of 100–150 μm, while the thickness of the paper is about 400–500 μm. Thus, the entire depth of the filter was never completely ablated to achieve the best sensitivity and to prevent contamination from the double-sided tape. Fig. 1C shows a DUS specimen after ablation of 5 of these coronas.

As for issue (b), in order to compensate for both instrumental as well as for matrix-dependent non-spectral mass discrimination, use of Ni as an internal standard (IS) was evaluated.[21,38] In order to do so, the simultaneous aspiration of a Ni solution that reaches the plasma together with the laser aerosol is required. This strategy results in a wet plasma, which is in principle more robust than a dry one.[39–41] Selection of Ni instead of Zn, another element often selected as an IS for Cu isotope analysis by MC-ICPMS,[42–44] was preferred as the Ni ionization potential is more similar to that of Cu, and Ni is also less prone to suffer from contamination issues than Zn.[12,45]

On the other hand, the MC-ICPMS instrument used in this work offers the possibility to enhance the spectral resolution by using a high-resolution entrance slit (narrower) while still using

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

Table 2 $^{65}Cu/^{63}Cu$ ratios obtained when introducing Cu from a solution or ablated from a filter paper, as a function of the resolution used. The effect of depositing a 2500 mg L^{-1} NaCl solution on the filter paper is also evaluated. When Cu was introduced from a solution, a blank filter was ablated concomitantly. Analytical uncertainty represents 2SD on the average value obtained for the different replicates ($n = 5$)

		No NaCl		With NaCl	
Cu introduction	Mass resolution	Uncorrected measurement	Ni as IS	Ni as IS	Cu "natural" ratio[37]
Solution	Low resolution	0.46950 ± 0.00005	0.44630 ± 0.00010	0.42775 ± 0.00180	0.44613
Solution	Pseudo high res	0.46935 ± 0.00015	0.44655 ± 0.00014	0.44448 ± 0.00048	0.44613
Deposition on filter	Pseudo high res	0.46880 ± 0.00024	0.44606 ± 0.00021	0.44499 ± 0.00044	0.44613

a low resolution detector slit. Therefore, the peaks from the interference and the analyte are not totally resolved, as keeping a flat top peak shape is required to maintain the best isotopic precision,[46] but there is a wide window wherein only the analyte ion contributes to the signal intensity and where the signal is still flat. This pseudo high-resolution mode of operation is well-known[10,38,46] and has been used successfully before for Cu isotope analysis.[47] In the current case, the optimum position for measuring was evaluated before every sample measurement, and the $^{63}Cu^{+}$ signal was measured approximately 0.053 m/z away (drifted to a lower mass) from the central position that would have been selected in the absence of any potential overlap.

The success of these correction strategies can be evaluated from the results presented in Table 2. For this purpose, several measurements were carried out either by aspirating a 40 μg L^{-1} Cu solution while a blank filter paper was being ablated, or by ablating a Cu solution that was deposited onto the filter paper and dried (see Section 2.2.2.), and prepared in such a way that a similar Cu signal was obtained in both cases. Moreover, additional experiments in which a 2500 mg L^{-1} NaCl solution was also deposited onto a filter paper previously spiked with a Cu solution were also performed.

As can be appreciated, when working at low mass resolution, ablation of a blank filter does not seem to represent any significant negative effect. There were no indications of matrix effects (the signal for the Ni spike was very constant whether the filter paper was simultaneously ablated or not), the value for the Cu solution, after correction for instrumental mass bias, is close to the expected natural ratio, and the precision is rather good (approx. 100 ppm RSD for a signal of ^{63}Cu approx. 1 V). However, if the filter ablated contains NaCl the situation is very different. Clear indications of matrix effects can be observed on the Ni signal intensity, precision deteriorates by a factor of 20 and a bias of more than 4% appears. This problem can be minimized working in pseudo high-resolution, as described before. This working mode represents a significant decrease in sensitivity (approx. 10-fold), which typically results in a lower precision in the absence of the interfering species but, when NaCl is present, the bias observed significantly decreases and the precision is 4–5 times better. Similar results are obtained when Cu is not introduced from the solution but rather ablated from the filter paper, thus opening possibilities for analysis of real samples.

Therefore, this approach of ablating coronas and monitoring $^{63,65}Cu$ off-peak was used in further work.

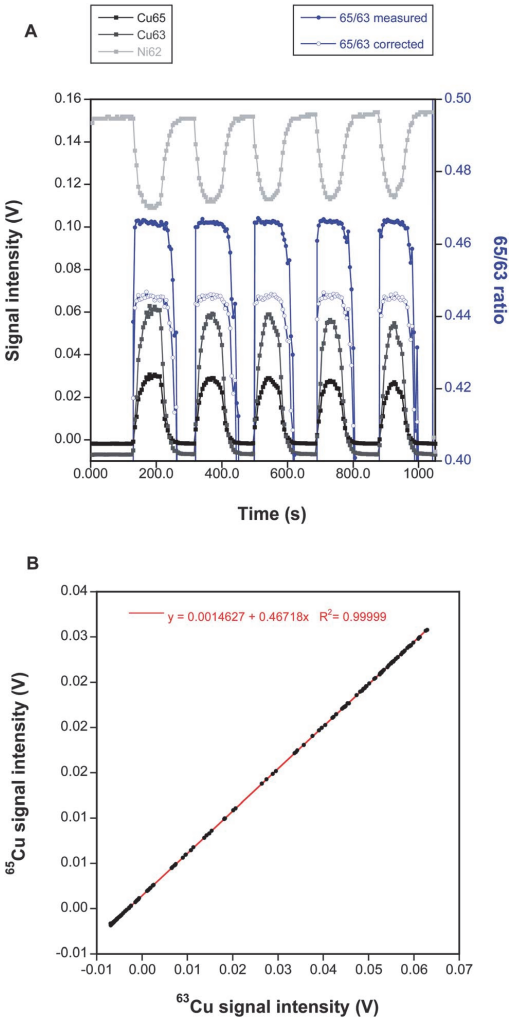


Fig. 2 (A) Example of a time-resolved signal obtained when ablating a DUS sample (16 mm diameter) at five different locations (starting from the rim) using the corona sampling approach. The uncorrected and corrected (using Ni as an internal standard) $^{65}Cu/^{63}Cu$ ratios calculated for every measurement available are also plotted against the right y-axis. (B) ^{65}Cu *vs.* ^{63}Cu plot for the same raw measurements shown in (A).

3.3 Calculating the isotope ratio when dealing with short transient signals

The results obtained so far were considered as promising but there is still a margin for further improvement depending on the way in which transient signals are treated.

Fig. 2A shows a typical signal obtained when a DUS sample is ablated following the corona shape strategy. 5 different replicates are obtained. As can be seen, the signal is relatively stable (it decreases a bit when ablating inner areas, as expected) and the introduction of a matrix into the plasma is accompanied by signal suppression, as clearly indicated by the drop in the Ni signal intensity value.

Now, the traditional way to process this data would be to use a point-by-point method where the 65/63 ratio for every measurement (1 value every 5 seconds) is calculated using the signal intensities (blank-corrected) for ^{65}Cu and ^{63}Cu. The 62/61 ratio can be calculated also in the same way, and Russell's exponential law for mass bias correction can be finally applied to obtain the corrected 65/63 ratio for every data point. This is illustrated in Fig. 2A where all 65/63 values are plotted. Obviously, the approach seems to work to some extent as the corrected ratio provides a value much closer to the natural one than the uncorrected measure. Lastly, the final 65/63 ratio can be estimated as the average obtained for the duration of every transient signal, which can be calculated after setting the limits where every measurement is to be integrated. Normally, the stable flat top portion of every 65/63 signal replicate is integrated, although there is always some uncertainty as to how to set these limits, which may affect the result obtained.

However, an alternative approach was proposed by Fietzke *et al.*,[22,23] specifically designed for the short transient signals typically obtained by means of LA-MC-ICPMS. The idea is to plot the signal intensities for ^{65}Cu against the signal intensity for ^{63}Cu, and the slope of the regression curve directly provides the raw ^{65}Cu/^{63}Cu ratio, which can be later mass bias corrected applying Russell's exponential law using the average value of the ^{62}Ni/^{61}Ni ratio measured during the same period. This simple approach provides significant advantages in this situation as it uses all the data, avoiding any subjective influence that may occur by setting the integration limits. But perhaps its main advantage is that each data point contributes to the fit depending on its signal intensity (high intensity values will influence more the final slope than low intensity values), while in the classical approach all points contribute to the same extent (unless they are excluded). Fig. 2B shows the application of this approach to the same data points used for Fig. 2A. As can be seen, a remarkably good linear fit is attained, and the slope provides the uncorrected ^{65}Cu/^{63}Cu ratio. In practice, in order to obtain an estimation of the imprecision, the signals obtained for ablation of every corona were processed separately in the current work, thus obtaining five replicates per sample.

In order to establish which processing procedure would provide the best results, a urine sample from a WD patient was deposited on 5 different filter paper discs and LA-MC-ICPMS analysis was carried out on different sessions, using both approaches for data calculation. The results are shown in Fig. 3. The internal precision[39] obtained by means of both approaches is similar (RSD values ranging between 200 and 500 ppm for 5 replicates), but the external precision obtained by means of the linear regression approach (LRS) is a factor of 5 better (RSD 540 *vs.* 2480 ppm), as the values obtained by means of the point-by-point (PBP) approach deviate more between sessions. This difference is statistically significant at the 95% confidence level ($F_{value} = 20.810$; $F_{critical} = 6.388$). Results obtained by means of

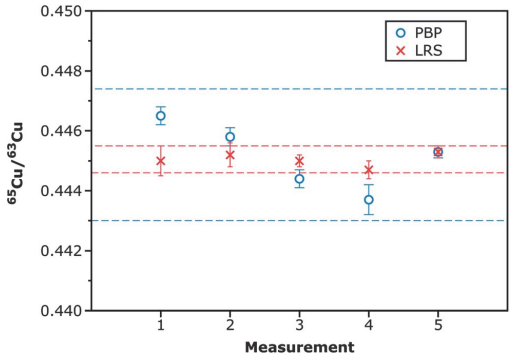


Fig. 3 ^{65}Cu/^{63}Cu ratios corrected for mass discrimination using Ni as an internal standard obtained after analysis of five different DUS specimens in which the same urine sample was deposited, following the procedure described in Section 2.2.2. The individual values obtained were processed according to either a point-by-point (PBP) approach or a linear regression slope (LRS) method. Internal precision values (error bars) are expressed as 2SD on the average value obtained for the five different replicates ($n = 5$) carried out for every sample. External precision values (dotted lines) for every processing approach are expressed as 2SD on the average value obtained for the five samples analyzed.

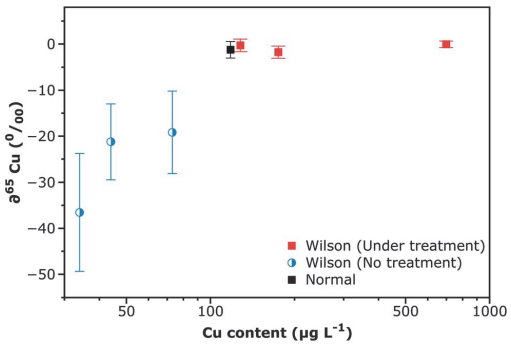


Fig. 4 Concentration *vs.* isotopic information plot for the urine samples of the different groups of individuals considered in the investigation. Isotopic values are expressed as deltas, *i.e.* as a relative difference (in per mil) *versus* a reference sample (urine from a person who does not suffer from WD but shows a similar Cu level to that found in untreated WD patients, 44 μg L^{-1}). Analysis was carried out as described in Section 2.3. Uncertainties (error bars) are expressed as 2SD on the average value obtained for the five different replicates ($n = 5$) carried out for every sample. The Cu level in urine samples was determined by GFAAS analysis. As a typical normal sample, a Clincheck Level II reference urine sample is shown. WD patients following treatment were those receiving penicillamine.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

the LRS method are thus more consistent, and this approach was selected for analysis of the samples. These results also serve to provide an idea of the reproducibility of the method for real urine sample analysis.

Finally, the possible influence of the sampling position on the $^{65}Cu/^{63}Cu$ ratio obtained was also investigated. As can be seen in Fig. 1D, there does not seem to be any significant difference. Thus, ablating coronas on the edge of the filter is preferred in order to attain the best possible sensitivity.

3.4 Analysis of the samples

The results obtained in the previous section seem promising enough to attempt analysis of the real samples. It can be stated that even though we have been reporting isotope ratios so far, our goal was not to report absolute values (a certified isotope reference material for Ni should be used otherwise) but rather to establish if there is any significant difference between WD patients and healthy persons. Thus, the results are expressed as delta values, *i.e.* as a relative difference (in per mil) *versus* a reference. There is no information on this point in the literature and thus, there is no idea on what precision level should be needed for the task. Analysis of the samples was undertaken, as described in Section 2.3.

The results obtained are shown in Fig. 4. Samples analyzed can be divided into three categories: (i) the ones selected as controls ("Normal" samples) corresponding to a urine reference sample (Clincheck® Level II), and a sample from a patient who did not suffer from WD but had a Cu level (44 μg L^{-1}) similar to that found in WD patients before any treatment. Therefore, the ratio experimentally obtained for this last sample was selected as a reference to calculate deltas for the rest of the samples (it thus represents the zero delta value); (ii) samples of people suffering from WD that are following a treatment with penicillamine (labelled as under treatment); and (iii) samples of people suffering from WD that were not yet following any treatment, as the same samples analyzed in this work were collected at the time of diagnosis.

The so-called normal samples tend to show a value close to the natural abundance, as expected. Interestingly, those samples of people with WD that are following a treatment with penicillamine also show a very similar ratio, leading to low delta values (−0.06 to −1.8‰) that overlap with zero when considering uncertainties. This could be explained as addition of this chelating agent is intended to free copper ions from the organs in which they are retained. Thus, these patients are practically excreting all Cu that they ingest through urine (their Cu levels in urine are therefore higher), and therefore there is no indication of fractionation in the Cu ratio. However, those WD patients that are not following any treatment yet show a significantly 65/63 lower ratio, leading to delta values in the −20 to −35‰ range, indicating that there is fractionation between the Cu that is metabolized and naturally excreted through urine, and the Cu that is ingested, as a consequence of this disease. It can be stressed that Cu isotopic analysis permits us to clearly separate these last samples from the one used as a reference (delta = 0), while if only elemental analysis is carried out that reference (Cu 44 μg L^{-1}) would be classified as potentially coming from a WD patient as well.

Hence, even though the number of samples available for investigation was small, it is the author's opinion that this work serves as a proof of principle confirming that isotope analysis may help in differentiating WD patients, and, eventually, may be a potent tool for early diagnosis of this disease.

It can also be noticed from the figure that the uncertainty of the measured ratios varies with the Cu content, reaching RSD values up to 2000–6000 ppm for samples of WD patients that were not treated yet. This is a direct consequence of the low signal intensity obtained for these samples, which was as low as 10 mV only. Note that when considering the larger corona (15–14.7 mm diameter) for these WD samples, the amount of copper introduced into the plasma during the 100 s ablation was lower than 250 pg. Here, for such low signals the LRS data reduction is particularly efficient compared to the conventional "point-by-point" method,[22] improving precision at a signal level close to the LOD, as demonstrated by Epov *et al.*[24]

Thus, future efforts should be directed to develop methodologies to further improve sensitivity (*e.g.*, using a MC-ICPMS device permitting us to achieve sufficient high-resolution to avoid ^{63}Cu and $^{40}Ar^{23}Na$ overlap at a lower sensitivity cost[38]).

4 Conclusions

The current work explores the potential of an approach based on: (a) deposition of urine (300 μL) onto precut (16 mm) clinical filter papers and drying; and (b) direct Cu isotopic analysis of the resulting samples by laser ablation, using a 257 nm femtosecond device operating at a high repetition rate (10 000 Hz), coupled to MC-ICPMS, for the establishment of a possible pattern to detect WD patients.

The results obtained indicate that, after proper optimization of (i) the sampling strategy (ablation of small coronas in the rim area of the filter), (ii) the MC-ICPMS conditions (working in pseudo high-resolution mode to avoid spectral overlap) and (iii) the way to process the resulting transient signal (use of a linear regression approach), it was possible to observe differences in the measured $^{65}Cu/^{63}Cu$ ratio for WD patients that were yet untreated (65/63 ratio biased low), in comparison with those that were under treatment with a chelating agent, which approximately showed the natural abundance value, as found for control samples.

These results hint that this procedure could be the basis of a non-invasive method for screening of WD, only requiring a few hundreds of μL of urine from the patient, while permitting easy storage and transportation of specimens to a referral center.

Acknowledgements

This work has been funded by the Spanish Ministry of Science and Innovation (Project CTQ2009-08606) and the Government of Aragón (Departamento de Ciencia, Tecnología y Universidad del Gobierno de Aragón y Fondo Social Europeo).

Notes and references

1 H. Kodama and C. Fujisawa, *Metallomics*, 2009, **1**, 42–52.
2 M. L. Schilsky, *Biochimie*, 2009, **91**, 1278–1281.
3 J. D. Gitlin, *Gastroenterology*, 2003, **125**, 1868–1877.
4 K. H. Schulpis, T. Karakonstantakis, S. Gavrili, C. Costalos, E. Roma and I. Papassotiriou, *Clin. Chem.*, 2004, **50**, 1253–1256.
5 A. M. Sutton, A. Harvie, F. Cockburn, J. Farquharson and R. W. Logan, *Arch. Dis. Child.*, 1985, **60**, 644–651.
6 European Association for the study of the liver, *J. Hepatol.*, 2012, **56**, 671–685.
7 E. A. Roberts and M. L. Schilsky, *Hepatology*, 2008, **47**, 2089–2111.
8 W. A. Gahl, *Clin. Chem.*, 2008, **54**, 1941–1942.
9 C. A. Kroll, M. J. Ferber, B. D. Dawson, R. M. Jacobson, K. A. Mensink, F. Lorey, J. Sherwin, G. Cunningham, P. Rinaldo, D. Matern and S. H. Hahn, *Mol. Genet. Metab.*, 2006, **89**, 134–138.
10 *Isotopic Analysis: Fundamentals and Applications Using ICP-MS*, ed. F. Vanhaecke and P. Degryse, Wiley-VCH, Weinheim, 2012.
11 F. Albarède, P. Telouk, A. Lamboux, K. Jaouen and V. Balter, *Metallomics*, 2011, **3**, 926–933.
12 F. Larner, M. Rehkämper, B. J. Coles, K. Kreissig, D. J. Weiss, B. Sampson, C. Unsworth and S. Strekopytov, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, **26**, 1627–1632.
13 L. Van Heghe, E. Engström, I. Rodushkin, C. Cloquet and F. Vanhaecke, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2012, **27**, 1327–1334.
14 K. Hotz, H. Augsburger and T. Walczyk, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, **26**, 1347–1353.
15 J. C. Rockett, G. M. Buck, C. D. Lynch and S. D. Perreault, *Environ. Health Perspect.*, 2004, **112**, 94–104.
16 E. Ricard, C. Pécheyran, G. Sanabria Ortega, A. Prinzhofer and O. F. X. Donard, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2011, **399**, 2153–2165.
17 C. Pécheyran, S. Cany, P. Chabassier, E. Mottay and O. F. X. Donard, *J. Phys.: Conf. Ser.*, 2007, **59**, 112–117.
18 G. Ballihaut, L. Tastet, C. Pécheyran, B. Bouyssiere, O. Donard, R. Grimaud and R. Lobinski, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2005, **20**, 493–499.
19 G. Ballihaut, F. Claverie, C. Pécheyran, S. Mounicou, R. Grimaud and R. Lobinski, *Anal. Chem.*, 2007, **79**, 6874–6880.
20 J. V. Mei, S. D. Zobel, E. M. Hall, V. R. de Jesús, B. W. Adam and W. H. Hannon, *Bioanalysis*, 2010, **2**, 1397–1403.
21 F. Vanhaecke, L. Balcaen and D. Malinovsky, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2009, **24**, 863–886.
22 J. Fietzke, V. Liebetrau, D. Günther, K. Gürs, K. Hametner, K. Zumholz, T. H. Hansteen and A. Eisenhauer, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2008, **23**, 955–961.
23 J. Fietzke, M. Frische, T. H. Hansteen and A. Eisenhauer, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2008, **23**, 769–772.
24 V. N. Epov, S. Berail, M. Jimenez-Moreno, V. Perrot, C. Pecheyran, D. Amouroux and O. F. X. Donard, *Anal. Chem.*, 2010, **82**, 5652–5662.
25 A. A. Almeida and J. L. F. C. Lima, *At. Spectrosc.*, 2001, **22**, 324–330.
26 M. Van Caillie-Bertrand, H. J. Degenhart, I. Luijendijk, J. Bouquet and M. Sinaasappel, *Arch. Dis. Child.*, 1985, **60**, 652–655.
27 M. Aramendía, L. Rello, F. Vanhaecke and M. Resano, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 8682–8690.
28 I. Horn and F. von Blanckenburg, *Spectrochim. Acta, Part B*, 2007, **62**, 410–422.
29 J. J. Gonzalez, D. Oropeza, X. Mao and R. E. Russo, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2008, **23**, 229–234.
30 K. Ikehata, K. Notsu and T. Hirata, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2008, **23**, 1003–1008.
31 J. González, S. H. Dundas, C. Yi Liu, X. Mao and R. E. Russo, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 778–784.
32 J. Koch and D. Günther, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2007, **387**, 149–153.
33 F. Vanhaecke, M. Resano, J. Koch, K. McIntosh and D. Günther, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2010, **25**, 1259–1267.
34 J. Koch and D. Günther, *Appl. Spectrosc.*, 2011, **65**, 155A–162A.
35 F. Claverie, B. Fernández, C. Pécheyran, J. Alexis and O. F. X. Donard, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2009, **24**, 891–902.
36 B. Fernández, F. Claverie, C. Pécheyran and O. F. X. Donard, *Trends Anal. Chem.*, 2007, **26**, 951–966.
37 M. Berglund and M. E. Wieser, *Pure Appl. Chem.*, 2011, **83**, 397–410.
38 L. Yang, *Mass Spectrom. Rev.*, 2009, **28**, 990–1011.
39 M. Aramendía, M. Resano and F. Vanhaecke, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2010, **25**, 390–404.
40 M. Resano, M. P. Marzo, R. Alloza, C. Saénz, F. Vanhaecke, L. Yang, S. Willie and R. E. Sturgeon, *Anal. Chim. Acta*, 2010, **677**, 55–63.
41 C. O'Connor, B. L. Sharp and P. Evans, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 556–565.
42 C. N. Maréchal, P. Télouk and F. Albarède, *Chem. Geol.*, 1999, **156**, 251–273.
43 S. Graham, N. Pearson, S. Jackson, W. Griffin and S. Y. O'Reilly, *Chem. Geol.*, 2004, **207**, 147–169.
44 S. E. Jackson and D. Günther, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2003, **18**, 205–212.
45 W. Li, S. E. Jackson, N. J. Pearson, O. Alard and B. W. Chappell, *Chem. Geol.*, 2009, **258**, 38–49.
46 F. Vanhaecke and L. Moens, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **378**, 232–240.
47 G. H. Fontaine, K. Hametner, A. Peretti and D. Günther, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **398**, 2915–2928.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

JAAS

RSC Publishing

PAPER

View Article Online
View Journal | View Issue

Isotopic analysis of Cu in serum samples for diagnosis of Wilson's disease: a pilot study

Cite this: *J. Anal. At. Spectrom.*, 2013, **28**, 675

Maite Aramendía,[ad] Luis Rello,[b] Martín Resano[c] and Frank Vanhaecke*[d]

Wilson's disease (WD) is a genetic disorder affecting Cu metabolism, which can lead to severe physiological and neurological symptoms, and even death if untreated. Based on the fact that WD patients show low Cu levels in serum, implementation of screening programs for diagnosis of this condition at the moment of birth, when progression of the disease can be still arrested, has been attempted in the past. These attempts, however, have been unsuccessful, as healthy new-borns often show low Cu levels in serum due to liver immaturity. In this work, the potential use of isotopic analysis of Cu in serum samples as an alternative diagnostic parameter for Wilson's disease has been investigated. For this purpose, the Cu isotopic composition of a set of serum samples from different groups showing either low (*i.e.* WD patients, patients who had undergone bariatric surgery, infants) or normal (supposedly healthy adults) Cu concentration levels was determined by means of multi-collector ICP-mass spectrometry (MC-ICP-MS), after chromatographic isolation of Cu. For this purpose, AG-MP-1 strong anion exchange resin was relied upon, enabling quantitative recovery of Cu in pure form from the serum samples. MC-ICP-MS measuring conditions were optimized to avoid the influence of spectral overlap, and Ni was admixed as an internal standard for correction of instrumental mass discrimination. The use of this optimized method provided δ^{65}Cu for the serum samples with a typical analytical uncertainty of $\pm 0.20‰$ ($k = 2$). Our results show that, for the population considered in this study, combination of Cu concentration values and Cu isotopic information allows classification of WD patients, infants and controls into different groups, while the use of concentration values only is not sufficient for this purpose. Although further studies with a larger number of samples are needed, results are encouraging as far as the use of Cu isotopic analysis for early diagnosis of Wilson's disease is concerned.

Received 27th November 2012
Accepted 6th February 2013

DOI: 10.1039/c3ja30349g

www.rsc.org/jaas

1 Introduction

Cu is an essential element required for the proper functioning of several metalloenzymes with oxidase activity taking part in numerous cellular processes. In spite of its essential role, regulation of the amount of Cu in the body is critical, because, as a result of its oxidative potential and if present in the unbound form, Cu induces reactive free radical production that eventually results in cellular damage.[1] The pathways for Cu metabolism and regulation in the human body can be summarized as follows. Cu intake mainly takes place in the duodenum and proximal small intestine, where approximately 50% of dietary Cu is absorbed and then transferred into the blood *via* portal circulation in a process facilitated by complexing of Cu with amino acids and albumin. Most of this dietary Cu is then taken up by the liver, where this element is incorporated into ceruloplasmin, a ferroxidase protein essential for Fe metabolism, which represents about 75–90% of the total Cu content in plasma.[2] In mammals, intestinal Cu uptake does not seem to be regulated and Cu homeostasis is achieved primarily by adjusting biliary excretion of this element.[3,4]

Disruption of the normal Cu homeostasis leading to a toxic excess of Cu is evident in Wilson's disease (WD), a genetic disorder affecting approximately 1 out of 30 000 individuals.[5] Wilson's disease is caused by mutations in the *ATP7B* gene, which encodes the ATP7B protein. ATP7B facilitates the incorporation of Cu ions into ceruloplasmin and its release into the bloodstream, as well as the removal of excess Cu by secreting it into the bile.[6] In WD patients, both functions of ATP7B are impaired. As a first consequence, ceruloplasmin is secreted in a form that lacks Cu (named apoceruloplasmin), which is rapidly degraded in the bloodstream.[7] Furthermore, Cu excretion *via* bile is also affected, so that this element starts accumulating in the liver. Cu hepatic overload leads to hepatocyte dysfunction, cell death and eventual release of this element into the blood, which ends up in the gradual accumulation of Cu in other body

[a]*Centro Universitario de la Defensa-Academia General Militar de Zaragoza, Carretera de Huesca s/n, 50090, Zaragoza, Spain*
[b]*Department of Clinical Biochemistry, "Miguel Servet" University Hospital, Paseo Isabel La Católica 1-3, 50009, Zaragoza, Spain*
[c]*Department of Analytical Chemistry, Faculty of Sciences, University of Zaragoza, Pedro Cerbuna 12, 50009, Zaragoza, Spain*
[d]*Department of Analytical Chemistry, Ghent University, Krijgslaan 281-S12, 9000, Ghent, Belgium. E-mail: Frank.Vanhaecke@UGent.be*

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

tissues, mainly the central nervous system. As a result of all of the above, WD patients first present hepatic and/or neurological symptoms, which may evolve to a severe medical condition and even lead to death if untreated.[5]

Cost-effective and relatively simple treatments are available for WD and are based on lifelong administration of Cu chelating agents, which can arrest progression of the disease in symptomatic patients and prevent the development of symptoms if begun while the patient is asymptomatic.[8] As WD is a genetic condition affecting the patient from the moment of birth and effective therapies are available, this disease would be a perfect candidate for new-born screening programs.[9] Unfortunately, diagnosis of WD is challenging for clinicians, both for symptomatic and asymptomatic patients, and therefore, the search for alternative diagnosis methods for this disease is a field of extensive research,[8,10] with special interest in the field of paediatrics.[9,11]

At the moment, there are no 100% reliable markers for WD, and diagnosis is often achieved by applying a scoring system, combining clinical symptoms and biochemical data.[12] Significant biochemical data related to this condition include high Cu levels in the liver tissue (considered as the golden standard), detection of which requires a liver biopsy. Additionally, other less invasive markers exist, such as low serum levels of Cu and ceruloplasmin or slightly elevated Cu excretion in the urine,[13] for which suitable analytical methodologies based on deposition of the samples on clinical filter papers could, in principle, be developed,[14,15] thus potentially profiting from the new-born screening programs based on the use of filter papers, already implemented around the world. The problem with these minimally invasive markers, however, is that overlapping concentration ranges have been observed between controls and WD-affected patients, especially for infants and new-borns. In fact, even if functioning of Cu transporters is not affected, young infants show considerably lower serum Cu and ceruloplasmin levels than adults due to liver immaturity.[7,16,17] For this reason, the use of Cu or ceruloplasmin concentrations to screen newborns for WD has proven unsuccessful.[18]

As a result, the possibility of using the isotopic composition of Cu in biological fluids as a marker instead of relying on the Cu concentration is an alternative worth exploring. In fact, the defective ATP7B protein in WD patients results, in the first place, in a much lower efficiency of Cu incorporation into ceruloplasmin (which, as mentioned before, contains the majority of Cu in serum). When this process is accompanied by isotope fractionation, preferential presence of one of the two naturally occurring Cu isotopes (^{63}Cu and ^{65}Cu) in biological fluids could become more apparent for WD patients than for people with low levels of Cu due to other reasons and with the correct functioning of this protein (for instance, young infants or adults following bariatric surgery procedures) and/or the reference population.[19] If this hypothesis is proven correct, the Cu isotopic analysis of biological fluids might open new possibilities for early detection of WD.[19]

In this regard, evidence for such Cu fractionation has been provided in a recent project aiming at Cu isotopic analysis of the urine of WD patients.[20] In that project, the direct determination of Cu isotope ratios in urine samples deposited onto clinical filter papers was carried out by means of femtosecond laser ablation coupled to multi-collector-inductively coupled plasma-mass spectrometry (fs-LA-MC-ICP-MS). Evidence of ^{65}Cu depletion was found in the urine of untreated WD patients compared to control (supposedly healthy) individuals, even though the analytical uncertainty associated with the results presented in that paper was relatively large due to the complexity of the methodological approach used in the investigation. It seems clear from these results that further studies with better-established analytical methodologies and extension of the analysis to a larger number of patients and/or alternative samples (*e.g.*, serum) frequently used for monitoring WD would be desired for confirming these findings.

It was the goal of this work to investigate the potential use of Cu isotope ratios in biological fluids for diagnosis of Wilson's disease. For this purpose, the Cu isotopic composition of a set of serum samples from WD patients, individuals showing low serum Cu concentrations for different reasons (*i.e.* young infants and patients who had undergone bariatric surgery) and supposedly healthy donors was determined by means of MC-ICP-MS, after chromatographic isolation of Cu. Considering the difficulty in finding representative samples for this kind of study, selection of serum is based on the fact that Cu is routinely determined in this type of sample so that a sample collection that is sufficiently large for a pilot study was available from previous medical studies.

2 Experimental

2.1 Samples and standards

2.1.1 Standards and reagents. All digestion, isolation and dilution protocols were carried out in a class-10 clean lab and Teflon Savillex® beakers were used throughout the study for sample handling. Pro-analysis grade HNO_3 and HCl were purchased from Chem-Lab (Belgium) and were further purified by sub-boiling distillation in either quartz (12 M HCl) or PTFE (14 M HNO_3) stills. Ultrapure 9.8 M H_2O_2, Fluka TraceSELECT®, was purchased from Sigma-Aldrich (Belgium), while ultrapure water (resistivity $\geq$ 18.2 MΩ cm) was obtained from a Milli-Q Element water purification system (Millipore, Mollsheim, France). Multi-element and single-element standard solutions used for quantitative analysis and the Ni single-element standard solution used for mass bias correction were prepared from commercially available 1 g L^{-1} stock solutions (Inorganic Ventures, The Netherlands) after proper dilution with 0.4 M HNO_3.

Results for Cu isotopic analysis are expressed as delta values, *i.e.* as a relative difference (in per mil) *versus* a reference. In this case, an in-house Cu isotopic standard was used as the reference for all determinations to reduce the consumption of the valuable NIST SRM 976 isotopic reference material, which is no longer available from NIST. This in-house standard was prepared from a commercially available 1 g L^{-1} Cu stock solution (Inorganic Ventures, The Netherlands; lot C2-Cu02116), which had been isotopically characterized in a previous project carried out in our research group and shows a δ^{65}Cu value of 0.22 ± 0.07‰ (n = 28) relative to the NIST SRM 976 material.[21]

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

For isolation of the target analyte, Poly-Prep chromatography columns (2 mL resin bed, 10 mL reservoir) were filled with AG-MP-1 (100–200 mesh) strong anion exchange resin. Both the columns and the resin were acquired from Bio-Rad (Hercules, CA, USA).

2.1.2 Samples and sample preparation. Serum samples analyzed in this study were obtained from the Hospital Universitario Miguel Servet (Zaragoza, Spain). A total of 28 samples were available for analysis. Five of these samples came from WD patients. Five of the samples came from patients with low serum Cu levels due to other reasons than WD, namely 3 patients who had been subjected to bariatric surgery and 2 young infants (12 days and 6 months old, respectively). The rest of the samples came from supposedly healthy (adult) donors and were used as controls. Blood samples were originally collected in serum BD Vacutainer® tubes (reference 369868). After centrifugation, serum samples were subjected to different analyses at the hospital, including determination of total Cu levels by means of flame atomic absorption spectrometry (FAAS). The remaining sample portions (about 1–2 mL per sample) were transferred to 4.5 mL cryogenic tubes (cryotubes, reference 363452, Nunc®, Roskilde, Denmark) and were kept at −80 °C until isotopic analysis. Due to the small volumes available, most samples were analyzed only once. Replicate analyses were carried out for one of the control samples for which a larger volume was available, so that the Cu isolation protocol could be validated and the method reproducibility assessed.

For sample digestion, 6 mL of 14 M HNO_3 and 1 mL of 9.8 M H_2O_2 were added to 1–2 mL of the sample (depending on the total amount available) and this mixture was kept at 110 °C for 8 h in a closed vessel until a pale yellow digest was obtained. Large volume (60 mL) Teflon Savillex® beakers were used to prevent sample losses due to foaming.

Cu isotopic analysis was performed on purified Cu solutions obtained by using a modification of the chromatographic separation method proposed by Maréchal *et al.*,[22] recently validated in our research group for Cu, Fe and Zn isotopic analysis of blood.[21] A summary of this separation method is included in Table 1. Before column chromatography, the sample digests were evaporated to dryness on a hot plate (7–8 h at 95 °C) and the residue was redissolved in 5 mL of (8 M HCl + 3×10^{-4} M H_2O_2). This mixture was allowed to stand for 1 h before loading on the chromatographic column to make sure that all of the Cu was in its higher oxidation state. Next, Bio-Rad Poly-Prep columns were filled with 2 mL of AG-MP-1 resin, and a piece of cotton was used as a stopper on top of the resin bed. Before use, the AG-MP-1 resin was allowed to settle 3 to 4 times in water and the supernatant was thrown away in order to eliminate the finest resin particles. Prior to each elution, the resin was gently washed with 10 mL of 0.7 M HNO_3 and 10 mL of deionized water and it was subsequently conditioned with 10 mL of (8 M HCl + 3×10^{-4} M H_2O_2). After sample loading (300–2500 ng Cu), the matrix was eluted with 8 mL of (8 M HCl + 3×10^{-4} M H_2O_2) and, subsequently, Cu was eluted with 12 mL of (5 M HCl + 3×10^{-4} M H_2O_2). After isolation, the Cu fractions were evaporated to dryness at 95 °C (10–12 h) and redissolved in 5 mL of 0.7 M HNO_3. This last procedure was repeated twice. 100 μL aliquots of these solutions were diluted 10-fold with 0.4 M HNO_3 and were used for checking Cu concentrations using an Element XR sector field (SF)-ICP-MS instrument, following the experimental protocol described in Section 2.2. Before isotopic analysis, the Cu concentration of every sample was adjusted to 200 μg L^{-1} to avoid variations in concentration to affect the extent of instrumental mass discrimination. For this purpose, an adequate volume of each Cu fraction was evaporated to dryness at 95 °C and was retaken into solution with 1.5 mL of a 500 μg L^{-1} Ni solution prepared in 0.4 M HNO_3.

Table 1 Anion exchange chromatography for isolation of Cu from a serum matrix

Step	Volume (mL)	Medium
Resin loading	2	AG-MP-1 (100–200 mesh); cotton stopper
Cleaning	10	0.7 M HNO_3
	10	Ultrapure H_2O
Conditioning	10	8 M HCl + 3×10^{-4} M H_2O_2
Sample load	5	8 M HCl + 3×10^{-4} M H_2O_2
Matrix	8	8 M HCl + 3×10^{-4} M H_2O_2
Cu elution	12	5 M HCl + 3×10^{-4} M H_2O_2

2.2 Instrumentation and measurement protocol

A flame atomic absorption spectrometer (ASS) novAA300 from Analytik Jena (Jena, Germany) was used for determining the Cu levels in the serum samples at the Department of Clinical Biochemistry of the Hospital Universitario Miguel Servet. This lab participates in an International Proficiency Testing Program for trace metal analysis and performs satisfactorily (OELM Serum, Trace Elements External Quality Assessment Scheme organized by the Société Française de Biologie Clinique).

An adaptation of the classical FAAS method for Cu determination in serum described in the clinical chemistry literature was used for analysis.[23] The serum samples are 10-fold diluted with a 0.028 M HNO_3 solution and directly introduced in the FAAS spectrometer. Optimized conditions for highest detection power were achieved by deploying the Cu line at 324.8 nm, a fuel flow of 40 L h^{-1} (ratio of C_2H_2/air = 0.075) and a burner height of 6–7 mm, which yielded a LOD of 30 μg L^{-1}.

Concentration measurements for validation of the Cu isolation protocol, for assessment of the content of the Cu isolated before isotopic analysis and for evaluation of potential interferences were carried out using an Element XR SF-ICP-MS instrument (Thermo Scientific, Bremen, Germany). With this instrument, the sample introduction system consisted of a 200 μL min^{-1} quartz concentric nebulizer and a cyclonic spray chamber. External calibration with the addition of Ni as an internal reference was deployed for all quantifications. The settings for this instrument are summarized in Table 2.

Isotope ratio measurements were performed using a Neptune MC-ICP-MS instrument (Thermo Scientific, Bremen, Germany). With this instrument, sample introduction was accomplished *via* a 100 μL min^{-1} PFA nebulizer mounted onto a double pass spray chamber, a combination of a Scott-type and a

cyclonic spray chamber, which provides better signal stability. The instrument settings and data acquisition parameters used are also given in Table 2.

Cu concentrations for the sample and isotopic standard solutions were adjusted to 200 μg L^{-1} to avoid variations in concentration from affecting the extent of mass bias, and were subsequently measured in a standard (2×)–sample (2×)–standard (2×) bracketing sequence. Measurements of procedural blanks were performed at the beginning of every working session and typically accounted for less than 0.2% of the total signal obtained for the corresponding Cu isotopes. Mass calibration was repeated every day. Instrumental mass bias correction was performed using admixed Ni at a concentration of 500 μg L^{-1}. This element was selected as it has been found to be more robust (is less prone to contamination, provides slightly better reproducibility and shows a better matching with Cu in terms of ionization energy) for this purpose than Zn, the other element usually deployed for correcting Cu isotope ratios for instrumental mass discrimination.[24,25] After automatic removal of the outliers based on a 2s-test, the data obtained were treated off-line for mass bias correction and delta calculation, using the revised exponential model described by Baxter and co-workers[26] and the $^{62}Ni/^{60}Ni$ ratio. Although requiring long measurement sessions for controlling the uncertainty associated with the correction process, this method is acknowledged as one of the best choices for mass bias correction as both the matrix-induced mass bias and the temporal mass bias drift can be corrected for.[27] As the main purpose of this study was to assess the potential occurrence of significant differences in the isotopic composition of Cu in serum samples, all delta values are reported with respect to the in-house Cu standard to avoid enlargement of the uncertainty budget by recalculating the results with respect to the NIST SRM 976 isotopic standard. The NIST standard, however, was used as a quality control sample, and was monitored at the beginning and at the end of each of the three measurement sessions carried out. Satisfactory delta values against the in-house standard in agreement with the expected values were obtained for NIST SRM 976 in all cases.

Table 2 Single and multi-collector ICP-MS instrument settings and data acquisition parameters

Element XR sector field – ICP-MS	
Sample uptake rate	200 μL min^{-1}
Ar plasma/auxiliary flow rates	15/0.85 L min^{-1}
Ar nebulizer gas flow rate	1.13 L min^{-1}
RF power	1250 W
Guard electrode	Connected
Sampling cone and skimmer	Ni
Mass resolution	Medium resolution ($R \sim 4000$)
Scan type	E-scan
Dwell time per acquisition point	10 ms
Acquisition points per peak	25
Mass window scanned	125%
Runs and passes	3 × 4
Nuclides monitored	^{60}Ni, ^{63}Cu, ^{65}Cu, ^{23}Na, ^{25}Mg
Neptune MC – ICP-MS	
Sample uptake rate	100 μL min^{-1}
Ar plasma/auxiliary flow rates	15/0.7 L min^{-1}
Ar nebulizer gas flow rate	0.97 L min^{-1}
RF power	1250 W
Guard electrode	Connected
Sampling cone and skimmer	Ni
Mass resolution	Medium resolution
Scan type	Static, multi-collection
Integration time	4.2 s
Number of cycles per block	10
Number of blocks	6
Baseline correction	30 cycles (1.05 s each) at the beginning of every measurement
Cup configuration	L3: ^{60}Ni; L1: ^{61}Ni; C: ^{62}Ni; H1: ^{63}Cu; H3: ^{65}Cu

3 Results and discussion

3.1 Validation of the isolation procedure

Isolation of Cu from the serum matrix before isotopic analysis *via* MC-ICP-MS is highly recommended, not only for avoiding the influence of matrix-induced mass bias,[27] but also because in ICP-MS both Cu isotopes may be subject to spectral overlap due to the occurrence of polyatomic ions with the same nominal mass. In the context of this investigation, the most serious problem is the high amount of Na present in serum samples (in the range of 3000 mg L^{-1}), giving rise to $^{40}Ar^{23}Na^{+}$, interfering with Cu at m/z 63. Less important is the high levels of Mg that can also give rise to $^{40}Ar^{25}Mg^{+}$, interfering with Cu at m/z 65. Therefore, Cu isolation from the serum samples was carried out prior to isotopic analysis.

According to published data, the best way to carry out Cu isolation is by applying ion exchange chromatography, although careful validation of the protocol needs to be carried out as Cu is known to undergo on-column isotope fractionation.[28,29] In this work, we deployed a separation method based on the use of AG-MP-1 strong anion exchange resin recently developed and validated in our research group for Cu isotopic analysis of whole blood samples.[21] It was thus necessary to check the performance of this method for serum samples, which was tested through analysis of one of the control samples for which a sufficient amount was available for performing replicate analyses, referred to as QC-sample hereafter. Three 1.5 mL aliquots from the QC-sample were subjected to the digestion and separation protocols described in Section 2.1.2. Cu recoveries were calculated after analysis of the digests and the eluted Cu fractions by means of SF-ICP-MS, yielding an average of 100 ± 2% Cu recovery (1s), thus avoiding any effect from on-column isotope fractionation. To monitor Cu recoveries along the study, all of the samples targeted in the investigation were also analyzed for their Cu content after column separation, and the results obtained were compared with previously available FAAS concentration values. Near-quantitative Cu yields were obtained in all cases.

3.2 MC-ICP-MS measurement optimization: mass resolution settings

Although matrix elements should have been removed from the Cu fractions after separation in the AG-MP-1 column,

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

sometimes a small fraction of some of the matrix elements still ends up in the Cu fraction.[30] Consequently, the presence of parent elements (Na and Mg) potentially forming interfering ions was monitored in the Cu fractions together with the Cu concentrations by means of SF-ICP-MS. As expected from our previous experience,[21] it was found that Na was present in a significant concentration in some of the samples, and hence, it was decided to carry out all MC-ICP-MS measurements in medium mass resolution at the cost of losing sensitivity. It has to be pointed out that sensitivity constraints in this particular case were important due to the low Cu levels found in the samples from WD patients, the low amount of sample available and the impossibility of using the ion counters for the monitoring of the Cu isotopes due to the particular configuration of the Neptune MC-ICP-MS instrument deployed. About 200 μg L^{-1} was the maximum Cu concentration that could be achieved for the measurement solutions, yielding signals of about 4 V for $^{63}Cu^{+}$ ions.

The use of enhanced mass resolution in MC-ICP-MS instruments (the so-called "pseudo-high resolution") is well known,[27,31,32] and it has been used successfully for Cu isotope analysis before.[21,33] Spectral resolution is enhanced in this mode by using a high-resolution entrance slit (narrower) while still using a low resolution detector slit. Therefore, the peaks from the interfering ion and the analyte are not fully resolved, but there is a window wherein only the analyte ion contributes to the signal intensity and where the signal is still flat. For optimization of the measurement in this mass resolution mode, a 10 mg L^{-1} Na solution with a Cu concentration of about 1 μg L^{-1} was introduced (Na/Cu ratio = 10 000). As seen in Fig. 1, at this high Na/Cu ratio, it is possible to clearly differentiate the peaks from $^{63}Cu^{+}$ and $^{40}Ar^{23}Na^{+}$ when peak scans are performed, so that the distance from the peak centre to the location on the plateau where Cu can be measured interference-free can be determined. In the current case, the $^{63}Cu^{+}$ signal was measured approximately 0.038 u away (to a lower mass) from the peak centre where, as seen in Fig. 1, the measured $^{65}Cu/^{63}Cu$ isotope ratio is still not biased to lower values as a result of a contribution from the interfering $^{40}Ar^{23}Na^{+}$ ion. According to our calculations (based on the signal intensity obtained for the 10 mg L^{-1} Na solution and a pure 200 μg L^{-1} Cu solution, and the concentration measurements performed on the samples after column chromatography), the contribution of $^{40}Ar^{23}Na^{+}$ to the total signal intensity at a mass-to-charge ratio of 63 for the set of samples considered would roughly result in a maximum bias of −0.16‰ in the final $\delta^{65}Cu$ values obtained if the measurements were carried out at the centre of the peak, and this was observed only in the worst case scenario when the concentration of remaining Na in the measurement solution reaches 2 mg L^{-1}. In practice, the Na concentration value was always <2 mg L^{-1}, resulting in a Na/Cu ratio of <10 in all samples. Use of the medium resolution mode and careful selection of the measurement position completely avoid the influence of this interference, and was therefore used for all sample measurements, while any effect on the extent of mass discrimination was counteracted by relying on Ni as an admixed internal standard for its correction.

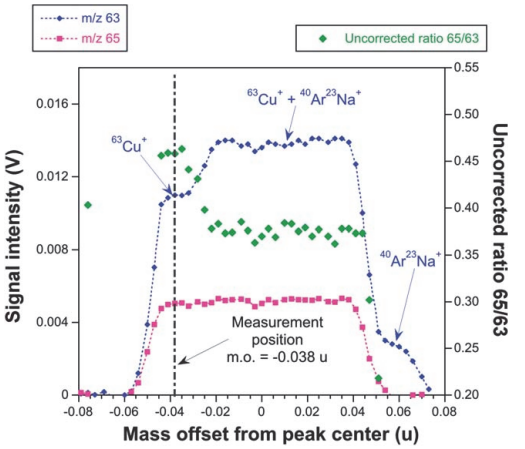


Fig. 1 Peak scan performed with the Neptune MC-ICP-MS instrument at medium mass resolution for a solution containing 10 mg L^{-1} Na and a Cu concentration of ~1 μg L^{-1}, using the instrumental parameters shown in Table 2. Values on the *x*-axis represent mass offset with respect to the peak centre at which each of the points represented was acquired, while values on the right *y*-axis represent the raw 65/63 ratios, *i.e.*, not corrected for mass bias.

3.3 Cu isotopic analysis of the serum samples

Finally the samples were analyzed following the optimized procedure indicated in Section 2.2. Before starting the measurements, careful peak alignment and selection of the measurement position (mass offset with respect to the peak centre, see Section 3.2) were made. As previously indicated, due to the low amount of sample available, all samples were analyzed only once. For characterizing the method reproducibility, the QC-sample for which replicate digestion and separation protocols had been carried out was analyzed for its isotopic composition. Each of the three replicates was analyzed in a separate measurement session, providing an external precision for the $\delta^{65}Cu$ values of ±0.20‰ (2s).

The Cu isotopic composition of serum for the different groups studied (*i.e.* patients with WD, patients having had bariatric surgery, infants – one 12 days old and one 6 months old – and control subjects) is summarized in Table 3. As seen in this table, all of the samples are enriched in the lighter isotope, although differences among the groups are evident. WD patients and, to a lesser extent, patients who had undergone bariatric surgery show significantly lower $\delta^{65}Cu$ values than the controls (either male or female) and infants. The low efficiency by which Cu is incorporated into ceruloplasmin in WD patients apparently results in ^{63}Cu enrichment in the serum samples. For patients who have undergone bariatric surgery, on the other hand, the low amount of circulating Cu results from a reduced intake of this element in the gut. Delta values obtained in this case seem to indicate that, to some extent, the lower Cu uptake in these patients also fractionates Cu towards the lighter isotope. It is interesting to point out that, out of the three patients who had undergone bariatric surgery, the one showing

Table 3 Cu isotopic composition of serum for the different groups of individuals studied (*i.e.* patients with WD, patients who had undergone bariatric surgery and infants) and control subjects, presented as δ^{65}Cu, the relative deviation (in per mil) *versus* the Cu in-house isotopic standard (average ± *s*)

Group	δ^{65}Cu
WD ($n = 5$)	-1.70 ± 0.66
Bariatric surgery ($n = 3$)	-1.21 ± 0.55
Infants ($n = 2$)	-0.54 ± 0.21
Controls ($n = 18$)	-0.72 ± 0.25
Males ($n = 7$)	-0.69 ± 0.30
Females ($n = 11$)	-0.73 ± 0.23

the largest fractionation effect (δ^{65}Cu = −1.84 ± 0.20‰) underwent the surgery in 2004, while the other two (δ^{65}Cu = −0.88 ± 0.20‰ and δ^{65}Cu = −0.90 ± 0.20‰) had it only in 2010. Although the low number of samples precludes drawing definitive conclusions, the importance of time cannot be ruled out as a factor influencing the degree of fractionation, especially since the Cu turnover is strongly affected in the case of problems with Cu metabolism. *Via* the use of a radioactive Cu-tracer, it has been shown that the turnover for Cu in the liver in a healthy person is 20–30 days, it increases to 600–700 days for patients with biliary cirrhosis and is >1800 days in the case of Wilson's disease.[34]

These differences among samples from different groups become even more evident when isotopic information is combined with Cu concentration data, as shown in Fig. 2. In this figure, a bivariate "concentration *vs.* δ^{65}Cu" plot, the different groups can be perfectly differentiated, except for WD patients and patients who had undergone bariatric surgery that cluster in the same area. However, differentiation between bariatric surgery and WD patients is not necessary for establishing a method for early WD diagnosis. The most important conclusion derived from the data shown in Fig. 2 is that isotopic information allows WD patients to be clearly differentiated, not only from controls, but also from infants, who also showed low Cu concentration values, but less negative δ^{65}Cu values. As seen from the figure, differentiation between WD patients and infants would not have been possible based upon the serum Cu concentration only, as overlapping ranges are observed. Introduction of isotopic information, however, permits to clearly discriminate both groups in all cases. Although a more extensive study, if possible including samples from young infants affected by Wilson's disease, needs to be carried out to confirm these observations, the results found are promising, pointing in the direction that the combination of elemental concentration and isotopic analysis of serum samples might serve as a valuable diagnostic tool for early detection of WD.

4 Conclusions

It was the purpose of this work to investigate the potential use of Cu isotopic analysis for the diagnosis of WD by analyzing a set of serum samples from different groups showing either low (*i.e.* WD patients, patients who had undergone bariatric surgery, infants) or normal (supposedly healthy adults) Cu concentration levels. It was found that Cu in serum samples for WD patients and, to a lesser extent, patients who had undergone bariatric surgery is significantly fractionated towards the lighter isotope when compared to serum samples of infants and control (healthy) individuals. For the population considered in

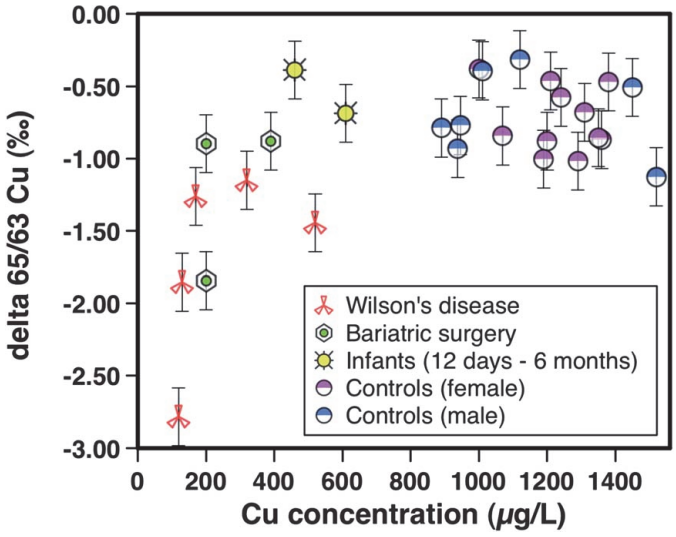


Fig. 2 "Concentration *vs.* isotopic information" plot for the serum samples of the different groups of individuals considered. Isotopic results were obtained after analysis of the samples following the procedure described in Section 2.2. Error bars represent analytical uncertainty ($k = 2$) as estimated from replicate analysis of the QC-sample ($n = 3$) (see Section 3.2 for details). The Cu concentrations were determined by FAAS analysis.

This journal is © The Royal Society of Chemistry 2013

this study, combination of concentration values and isotopic information allows perfect classification of WD patients, infants and controls into different groups, while patients who had undergone bariatric surgery cluster together with WD patients. Although further studies with a larger number of samples are needed, results are encouraging as far as the use of Cu isotopic analysis for early diagnosis of Wilson's disease is concerned.

Acknowledgements

The Flemish Research Foundation (FWO-Vlaanderen) is acknowledged for financial support through Research Project G002111N. The authors also thank the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness (Project CTQ2012-33494) and the Aragon Government (Convocatoria de Grupos DGA y Fondo Social Europeo). Maite Aramendía thanks the FWO for her post-doctoral grant. Finally, the help of E. Balliana with the MC-ICP-MS measurements is appreciated.

Notes and references

1 M. A. E. Letelier, S. Sánchez-Jofré, L. Peredo-Silva, J. Cortés-Troncoso and P. Aracena-Parks, *Chem.-Biol. Interact.*, 2010, **188**, 220–227.
2 H. Kodama and C. Fujisawa, *Metallomics*, 2009, **1**, 42–52.
3 J. R. Prohaska and A. A. Gybina, *J. Nutr.*, 2004, **134**, 1003–1006.
4 C. Wijmenga and L. W. J. Klomp, *Proc. Nutr. Soc.*, 2004, **63**, 31–39.
5 A. Ala, A. P. Walker, K. Ashkan, J. S. Dooley and M. L. Schilsky, *Lancet*, 2007, **369**, 397–408.
6 S. La Fontaine and J. F. B. Mercer, *Arch. Biochem. Biophys.*, 2007, **463**, 149–167.
7 J. D. Gitlin, *Gastroenterology*, 2003, **125**, 1868–1877.
8 M. L. Schilsky, *Biochimie*, 2009, **91**, 1278–1281.
9 W. A. Gahl, *Clin. Chem.*, 2008, **54**, 1941–1942.
10 European association for study of the Liver, *J. Hepatol.*, 2012, **56**, 671–685.
11 C. Kroll, M. Ferber, B. Dawson, R. Jacobson, K. Mensink, F. Lorey, J. Sherwin, G. Cunningham, P. Rinaldo and D. Matern, *Mol. Genet. Metab.*, 2006, **89**, 134–138.
12 P. Ferenci, K. Caca, G. Loudianos, G. Mieli-Vergani, S. Tanner, I. Sternlieb, M. Schilsky, D. Cox and F. Berr, *Liver Int.*, 2003, **23**, 139–142.
13 H. Kodama, C. Fujisawa and W. Bhadhprasit, *Brain Dev.*, 2011, **33**, 243–251.
14 M. Resano, L. Rello, E. Garcia-Ruiz and M. A. Belarra, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2007, **22**, 1250–1259.
15 M. Aramendía, L. Rello, F. Vanhaecke and M. Resano, *Anal. Chem.*, 2012, **84**, 8682–8690.
16 A. Sutton, A. Harvie, F. Cockburn, J. Farquharson and R. Logan, *Arch. Dis. Child.*, 1985, **60**, 644–651.
17 K. H. Schulpis, T. Karakonstantakis, S. Gavrili, C. Costalos, E. Roma and I. Papassotiriou, *Clin. Chem.*, 2004, **50**, 1253–1256.
18 Y. Yamaguchi, T. Aoki, S. Arashima, T. Ooura, G. Takada, T. Kitagawa, Y. Shigematsu, M. Shimada, M. Kobayashi, M. Itou and F. Endo, *Pediatr. Int.*, 1999, **41**, 405–408.
19 F. Albarède, P. Telouk, A. Lamboux, K. Jaouen and V. Balter, *Metallomics*, 2011, **3**, 926–933.
20 M. Resano, M. Aramendía, L. Rello, M. L. Calvo, S. Bérail and C. Pécheyran, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2013, **28**, 98–106.
21 L. Van Heghe, E. Engström, I. Rodushkin, C. Cloquet and F. Vanhaecke, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2012, **27**, 1327–1334.
22 C. N. Maréchal, P. Telouk and F. Albarède, *Chem. Geol.*, 1999, **156**, 251–273.
23 L. A. Kaplan and A. J. Pesce, *Clinical Chemistry: Theory, Analysis, Correlation*, Mosby, 5th edn, 2010.
24 F. Larner, M. Rehkämper, B. J. Coles, K. Kreissig, D. J. Weiss, B. Sampson, C. Unsworth and S. Strekopytov, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2011, **26**, 1627–1632.
25 E. Balliana, M. Aramendía, M. Resano, C. Barbante and F. Vanhaecke, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2013, DOI: 10.1007/s00216-012-6542-1.
26 D. C. Baxter, I. Rodushkin, E. Engström and D. Malinovsky, *J. Anal. At. Spectrom.*, 2006, **21**, 427–430.
27 L. Yang, *Mass Spectrom. Rev.*, 2009, **28**, 990–1011.
28 X. K. Zhu, Y. Guo, R. J. P. Williams, R. K. O'Nions, A. Matthews, N. S. Belshaw, G. W. Canters, E. C. de Waal, U. Weser, B. K. Burgess and B. Salvato, *Earth Planet. Sci. Lett.*, 2002, **200**, 47–62.
29 C. Maréchal and F. Albarède, *Geochim. Cosmochim. Acta*, 2002, **66**, 1499–1509.
30 J. B. Chapman, T. F. D. Mason, D. J. Weiss, B. J. Coles and J. J. Wilkinson, *Geostand. Geoanal. Res.*, 2006, **30**, 5–16.
31 F. Vanhaecke and L. Moens, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2004, **378**, 232–240.
32 M. Wieser, J. Schwieters and C. Douthitt, in *Isotopic Analysis. Fundamentals and Applications Using ICP-MS*, ed. F. Vanhaecke and P. Degryse, Weinheim, Germany, 2012, pp. 77–92.
33 G. H. Fontaine, K. Hametner, A. Peretti and D. Günther, *Anal. Bioanal. Chem.*, 2010, **398**, 2915–2928.
34 K. Gibbs and J. M. Walshe, *Clin. Sci.*, 1971, **41**, 189–202.